

Untersuchung von natürlichen Killerzellen in einem murinen NKG2D-Rezeptor-defizienten Spontan-Lymphommodell

Vorgelegt von

Lena Belting

2015

Aus dem Institut für Molekulare Immunologie des Helmholtz Zentrum Münchens
kommissarische Leitung: Prof. Dr. med. Ralph Mocikat

Untersuchung von natürlichen Killerzellen in einem murinen NKG2D-Rezeptor-defizienten Spontan-Lymphommodell

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Lena Belting
aus
Frankfurt am Main

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ralph Mocikat

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Martin Dreyling
Prof. Dr. Christoph Nerl

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2015

Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

*Untersuchung von natürlichen Killer-Zellen in einem murinen NKG2D-Rezeptor-defizienten
Spontan-Lymphommodell*

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und
alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche
kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nach-
gewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnli-
cher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht
wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Versicherung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung	VII
1 Einleitung	1
1.1. IMMUNSYSTEM	1
1.1.1. Angeborenes Immunsystem	1
1.1.2. Adaptives Immunsystem	6
1.2 TUMORIMMUNOLOGIE	7
1.2.1 Tumorgenese und Progression	7
1.2.2 Immunevasion von Tumoren	8
1.2.3 NK-Zellen in der Tumorimmunologie	9
1.3 DAS B-ZELL-LYMPHOM ALS MODELLTUMOR	10
1.3.1 Das Burkitt-Lymphom im humanen Organismus	10
1.3.2 Das Burkitt-Lymphom im murinen Spontanlymphom	10
1.4 AUFGABENSTELLUNG	11
2 Materialien und Methoden	13
2.1 MATERIALIEN	13
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	13
2.1.2 Reagenzien/Chemikalien	14
2.1.3 Vorgefertigte Zellseparations- und Analysesysteme	15
2.1.4 Zellkulturmedien und Puffer	15
2.1.5 Antikörper und Multimere	16
2.1.6 Software	17
2.2 METHODEN	17
2.2.1 Zellkultur	17
2.2.2 Tiermodell und Tierversuche	18
2.2.3 Durchflusszytometrie (FACS-Färbungen)	19
2.2.4 Immunmagnetische Zellseparation (MACS)	21
2.2.5 In-vitro-Kokultur	21
2.2.6 Zytotoxizität der NK-Zellen	22
2.2.7 Ermittlung des Zytokinprofils mittels Bioplex-Methode	22

2.2.8	DNS-Exktraktion und Polymerase-Kettenreaktion	23
3	Ergebnisse	24
3.1	EINFÜHRUNG DES MODELLORGANISMUS.....	24
3.1.1	Stammbaum.....	24
3.1.2	Bestimmung des Genotypen.....	25
3.2	NK-ZELLEN IM NKG2D-REZEPTOR-DEFIZIENTEN SPONTANLYMPHOM-MODELL	26
3.2.1	Anzahl der NK-Zellen im Tumorgewebe.....	27
3.2.2	NK-Zell-Maturierung	28
3.2.3	Phänotypisierung bezüglich der Aktivierungsmarker	29
3.2.4	In-vivo-Produktion von IFN-γ	31
3.2.5	In-vitro-Zytotoxizität bei NKG2D-Rezeptor-Defizienz	32
3.2.6	In-vivo-Untersuchung von CD107a.....	33
3.3	EINFLUSS DES TUMORMILIEUS.....	35
3.3.1	Zytokinmilieu im NKG2D-Rezeptor-defizienten Lymphom.....	35
3.3.2	In-vitro-Einfluss des Tumormilieus	36
3.4	WEITERE FOLGEN DER NKG2D-REZEPTOR-DEFIZIENZ.....	38
3.4.1	Expressionsniveau der NKG2D-Rezeptor-Liganden.....	38
3.4.2	Expression von CD3zeta.....	39
3.5	TUMORGENESE BEI NKG2D-REZEPTOR-DEFIZIENZ.....	40
4	Diskussion	42
4.1	NK-ZELLEN IM NKG2D-REZEPTOR-DEFIZIENTEN SPONTANLYMPHOM-MODELL.....	42
4.2	AKTIVIERUNGSINDUZIERT ERSCHÖPFUNG DER NK-ZELLEN.....	43
4.3	IN-VIVO-AKTIVIERUNGSMODELL FÜR NK-ZELLEN	45
4.4	DER NKG2D-REZEPTOR IN DER TUMORIMMUNOLOGIE	46
4.5	IMMUNEVASION IM SPONTANLYMPHOM.....	46
4.6	KLINISCH-THERAPEUTISCHE PERSPEKTIVEN	47
4.7	AUSBlick	48
5	Literaturverzeichnis.....	49
6	Anhang.....	55
6.1	VERÖFFENTLICHUNGEN	55
6.2	DANKSAGUNG.....	56
6.3	LEBENS LAUF.....	57

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
AR	Aktivierender Rezeptor
BCAP	<i>B-Cell Adaptor for PI3-Kinase</i>
Bp	Basenpaare
Bq	Becquerel
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNS	<i>Complementary DNS</i>
CEA	<i>Carcinoembryonic Antigen</i>
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt (<i>Cytotoxic T Lymphocyte</i>)
CXCL12	CXC-Motiv Chemokin 12
DAP10	<i>DNAX-activating protein 10</i>
DAP12	<i>DNAX-activating protein 12</i>
DZ	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
EBV	Epstein-Barr-Virus
E:T	Effektor-Zielzell-Ratio (<i>effector to target ratio</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
Fc	Kristallisierbares Fragment eines AK (<i>crystallisable</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

FKS	Fetales Kälberserum
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GLUT1	Glukose-Transporter 1
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
i.v.	Intravenös
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF	<i>Insuline-Like Growth Factor</i>
IL	Interleukin
IR	Inhibierender Rezeptor
KIR	<i>Killer-Cell-Immunoglobulin-Like-Receptor</i>
LK	Lymphknoten
MACS	<i>Magnetic Cell Separation</i>
MCMV	Muriner Zytomegalievirus (<i>Murine Cytomegalovirus</i>)
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MIC	<i>MHC Class-I-Polypeptide Related Chain</i>
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
mRNA	BotenRNS (<i>messenger RNA</i>)
Mult1	<i>Murine UL16-Binding-Proteinlike Receptor Transcript 1</i>
NKG2D	Natürliche Killer Gruppe 2, Mitglied D
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NZR	Natürlicher Zytotoxizitäts-Rezeptor
PAMPs	<i>Pathogene Associated Molecular Pattern</i>

PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PI3-K	Phosphoinositid-Kinase 3
PMA	Phorbolmyristataacetat
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
Rae-1	<i>Retinoic Acid Early Inducible Transcript 1 Protein</i>
RNS	Ribonukleinsäure
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
Th	T-Helfer-Zelle
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	Einheit (<i>unit</i>)
ULBP	<i>UL-16 Binding Protein</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

Zusammenfassung

Maligne Erkrankungen gehören weltweit zu den häufigsten Todesursachen. Durch Einführung neuer Therapiestrategien, deren Ziel das Auslösen und Verstärken körpereigener antitumoraler Immunantworten ist, könnte die Prognose einiger Tumorkrankheiten erheblich verbessert werden. Auch ein exogener Transfer von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) ist ein vielversprechender immuntherapeutischer Ansatz der gegenwärtigen onkologischen Forschung.

NK-Zellen als Teil der angeborenen Immunität könnten aufgrund ihrer Antitumor-Effektorfunktionen an der direkten Elimination von maligne transformierten Zellen beteiligt sein. Die Aktivierung der Effektorzellen erfolgt nach einem Zweischnitt-Modell und benötigt neben einem präaktivierenden Stimulus ein sekundär aktivierendes Signal, welches die Auslösung der Zytotoxizität zur Folge hat.

Jedoch konnten in einem murinen autochthonen Lymphom der B-Zell-Reihe, welches das Protoonkogen *c-myc* konstitutiv exprimiert und klinisch dem humanen Burkitt-Lymphom entspricht, vielseitige Tumor-assoziierte Störungen der NK-Zellen nachgewiesen werden. Zwar wurden NK-Zellen an den Ort des Tumorwachstums redirigiert und aktiviert, jedoch erwiesen sich die Zellen als funktionell anerg. Diese „aktivierungsinduzierte Erschöpfung“ zeigte sich bei abgelaufener Degranulierung und erhöhter Expression der Aktivierungsmarker CD45R und CD69 funktionell durch Wegfall der zytotoxischen Aktivität und Suppression der Produktion des Effektorzytokins Interferon- γ (IFN- γ). Die funktionelle Anergisierung der NK-Zellen im Tumormilieu hat auch für den therapeutischen Erfolg eines adoptiven NK-Zell-Transfers erhebliche Bedeutung.

Ursächlich wurde vermutet, dass eine im Laufe der Tumorprogression erfolgende Abnahme des sekundär aktivierenden *Natural-Killer Group 2 Member D*-Rezeptors (NKG2D-Rezeptor) auf NK-Zellen an der Entstehung der Anergisierung beteiligt ist. Einerseits spricht dafür eine auf frühe Tumorstadien beschränkte vermehrte Expression der stressinduzierten Liganden des NKG2D-Rezeptors, die wahrscheinlich mit einer anfänglichen Aktivierung und Degranulierung der NK-Zellen korreliert. Andererseits ist bekannt, dass eine chronische Interaktion des NKG2D-Rezeptors mit seinen Liganden zu einem Funktionsverlust des Rezeptors durch Internalisierung führt. Dies stellt einen Mechanismus der Tumorevasion dar und könnte den Verlust der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen bei Tumorprogression erklären.

Um eine mögliche Beteiligung des NKG2D-Rezeptor-Liganden-Systems an der Entstehung der „aktivierungsinduzierten Erschöpfung“ zu untersuchen, wurde ein NKG2D-Rezeptor-

defizientes Spontanlymphom-Modell, welches das Protoonkogen *c-myc* unter Kontrolle der regulatorischen Sequenz der Immunglobulin-Leichtkette λ exprimiert, eingeführt.

Es zeigte sich dabei, dass auch im NKG2D-Rezeptor-defizienten Spontanlymphom am Ort der primären Tumorgenese, den Lymphknoten, eine Anreicherung von NK-Zellen stattfand.

Ferner zeigten die NK-Zellen einen hohen Reifegrad und eine vermehrte Expression von CD69 und CD45R auf ihrer Zelloberfläche, was einem aktivierten Phänotyp entspricht.

Die redirigierten reifen und phänotypisch aktivierten NK-Zellen wiesen aber auch im autochthonen NKG2D-Rezeptor-defizienten Lymphom Störungen der Effektorfunktionen auf. So zeigten aus Tumoren isolierte NKG2D-Rezeptor-defiziente NK-Zellen *in vivo* eine Suppression der Produktion des Zytokins IFN- γ und keine signifikante Erhöhung des Degranulationsmarkers CD107a auf der Zelloberfläche. Die IFN- γ -Produktion konnte auch *ex vivo* durch Kokultur von aus gesunden NKG2D-Rezeptor-defizienten Spendern isolierten NK-Zellen mit Tumorzellen supprimiert werden.

Einen schwerwiegenden Einfluss auf die NK-Zell-Funktion hatte das Fehlen des NKG2D-Rezeptors insofern, als bei *nicht c-myc*-transgenen NKG2D-Rezeptor-defizienten NK-Zellen keine Zytotoxizität mehr vorhanden war.

Zusätzlich zeigte sich eine Persistenz der NKG2D-Liganden auf B-Zellen der Tumor-Lymphknoten. Da es andererseits im NKG2D-Rezeptor-kompetenten *c-myc*-transgenen Spontanlymphom zu einem fortschreitenden Verlust der NKG2D-Liganden-Expression während der Tumorprogression kam, deutet dies darauf hin, dass die Selektion gegen NKG2D-Ligand-exprimierende Tumorzellen ein Mechanismus der Immunevasion ist.

Im Ganzen führte die gestörte Tumorüberwachung bei NKG2D-Rezeptor-Defizienz zu einem gegenüber dem *c-myc*-transgenen Spontanlymphom signifikant früheren Krankheitsauftreten. Basierend auf den Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die Präaktivierung der NK-Zellen *in vivo* unabhängig vom NKG2D-Rezeptor erfolgt. Die Auslösung der zytotoxischen Aktivität benötigt hingegen zusätzlich das Signal des sekundär aktivierenden Rezeptors. Das frühere Versterben der NKG2D-Rezeptor-defizienten Tiere widerlegt den durch Ausbleiben der „aktivierungsinduzierten Erschöpfung“ erwogenen Überlebensvorteil. Ferner wurde die Bedeutung des NKG2D-Rezeptor-Liganden-Systems für die immunologische Tumorkontrolle verdeutlicht.

Ein immuntherapeutischer Ansatz z.B. durch *De-novo*-Introduktion von NKG2D-Liganden in Tumoren scheint unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit als sinnvoll und könnte zu einer effizienteren Antitumor-Antwort auch im Rahmen eines adoptiven NK-Zell-Transfers führen.

1 Einleitung

1.1. IMMUNSYSTEM

Das Immunsystem ist ein diverses und hochkomplexes System, welches in der Evolution zur Verteidigung des Organismus gegen pathogene Einflüsse entstanden ist. Dies beinhaltet zum einen die Elimination von exogenen Pathogenen und infizierten körpereigenen Zellen. Zum anderen sind auch die Überwachung, Kontrolle und Beseitigung von geschädigten oder maligne transformierten Zellen eine wichtige Funktion des Immunsystems [1, 2].

Grundsätzlich wird zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem unterschieden. Beide Komponenten verfügen über humorale und zelluläre, dem hämatopoetischen System entstammende Bestandteile und können zwischen autogenem und allogenen Gewebe unterscheiden.

Ein Fehlen wichtiger Abwehrmechanismen, wie z. B. beim angeborenen SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*)-Syndrom, ist nicht mit dem Leben vereinbar [3]. Selbst ein nur eingeschränkt funktionierendes Immunsystem, wie beim erworbenen AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) oder bei verschiedenen angeborenen Immundefekten, hat ohne Therapie lebensbedrohliche Konsequenzen [4]. Es kommt hierbei häufig zu schweren opportunistischen Infekten, verfrühter mutationsbedingter DNA-Schädigung und dadurch resultierende maligne Entartung der Zellen [4, 5].

1.1.1. ANGEBORENES IMMUNSYSTEM

Neben den physiologischen, chemischen und zellulären Barrieren des Körpers werden u.a. auch Makrophagen, dendritische Zellen (DZ) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zur angeborenen Abwehr gezählt. Dieses phylogenetisch ältere System ist v. a. auf die schnelle Erkennung und Beseitigung von Pathogenen und entarteten Zellen spezialisiert. Zur Erkennung der mutierten oder infizierten Zellen dienen dabei *Pattern Recognition Receptors* (PRRs), die vorhandene pathogen-spezifische molekulare Motive, die sogenannten *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs), erkennen [6]. Eine weitere wichtige Funktion des angeborenen Immunsystems ist die Produktion von Zytokinen und zytolytischen Proteinen, wie z. B. Interleukin-2 (IL-2), Interferon- γ (IFN- γ), Perforin oder Tumornekrosefaktor (TNF). Die bereitgestellten Mediatoren können u.a. eine Akute-Phase-Reaktion auslösen, selbst einen antiviralen Effekt ausüben oder andere Zellen und Organe beeinflussen. Zusätzlich stellen die humoralen Faktoren auch eine wichtige Verbindung zur adaptiven Abwehr her.

1.1.1.1. Dendritische Zellen (DZ)

Als antigenpräsentierenden Zellen (APZ) kommt den DZ eine besondere Rolle in der Vernetzung der angeborenen mit der adaptiven Immunantwort zu [7].

Im Rahmen der unmittelbaren Abwehr ist dabei v.a. die reziproke DZ-NK-Zell-Stimulation von Bedeutung [8, 9]. Die DZ-vermittelte Aktivierung von NK-Zellen erfolgt über einen sogenannten Präaktivierungs-Mechanismus, bei dem u.a. das von DZ freigesetzte Zytokin IL-15 von Bedeutung ist [10, 11]. NK-Zellen stimulieren die DZ sowohl über direkten Zellkontakt als auch über Sekretion von Zytokinen [11-13].

Die nach Aufnahme und Prozessierung von Antigenen aktivierten DZ wandern in regionale Lymphknoten ab. Dort erfolgt eine Interaktion mit den zur spezifischen Abwehr gehörenden T-Lymphozyten. Hierbei gelingt es den DZ, über die Präsentation von immunogenen Peptiden im Zusammenhang mit MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II Molekülen sowohl CD8⁺ zytotoxische T-Zellen als auch CD4⁺ T-Helferzellen zu stimulieren [14-16]. Zusätzlich werden über die DZ kostimulatorische Signale, die ebenfalls zur Aktivierung der adaptiven Abwehr führen, vermittelt.

Auf diesem Wege wird durch die Interaktion von DZ und NK-Zellen eine protektive Gedächtnisantwort eingeleitet [13].

1.1.1.2 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

Die dem Knochenmark entstammenden, über lymphoide Progenitoren im Rahmen der hämatopoetischen Entwicklung entstehenden NK-Zellen sind Teil der angeborenen Immunität. Als Mediatoren der Zytotoxizität sind sie v. a. in die schnelle Erkennung, Kontrolle und Beseitigung von virusinfizierten und entarteten Zellen involviert [17]. Zudem tragen NK-Zellen durch die Produktion des Effektorzytokins INF- γ zur Verknüpfung der angeborenen und der erworbenen Immunität bei [18].

Fallberichte von Individuen mit fehlenden NK-Zellen oder eingeschränkter NK-Zell-Funktion zeigen, dass die Betroffenen unter potenziell lebensbedrohlichen, meist opportunistischen, Infekten leiden [19, 20].

Der Kontakt einer NK-Zelle mit einer sensitiven Zielzelle führt über verschiedene molekulare Mechanismen zur Sekretion von Zytokinen und zur Polarisierung und Degranulation zytolytischer Vesikel [21]. Auf zellulärer Ebene erfolgt die Aktivierung von NK-Zellen durch die Integration der Signale von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren [22]. Zusätzlich kann die Aktivität durch die von Makrophagen oder von viral infizierten Zellen freigesetzten Zytokine IFN- α , IFN- β , IL-2, IL-12 und IL-18 stimuliert werden [23, 24].

Sowohl aktivierende als auch inhibierende Rezeptoren können entweder der Gruppe der *Lectin-Like*- oder der *Immunoglobulin-Like*-Rezeptoren zugeordnet werden [22, 25]. Bei den intrazellulären Sequenzen aktivierender Rezeptoren handelt es sich um *Immunoreceptor-Tyrosine-Phosphate-Activation*-Motive (ITAMs), bei denen der inhibitorischen Rezeptoren um *Immunoreceptor-Tyrosine-Phosphate-Inhibitory*-Motive (ITIMs) [26, 27].

Typische NK-Zell-aktivierende Signale sind stressinduzierte Proteine, die auf der Oberfläche von Zielzellen exprimiert werden [28, 29]. Diese Liganden der aktivierenden Rezeptoren (AR) führen über Signalkaskaden zu Zytokinproduktion und Zellaktivierung. Ein wichtiger ITAM-assoziiierter Rezeptor ist z. B. der aus der Gruppe der Natürlichen Zytotoxizitäts-Rezeptoren (NZR) stammende NKp46 [30]. Ein weiterer bedeutender mit der Aktivierung von NK-Zellen assoziierter Rezeptor ist der *Natural-Killer Group 2 Member D*-Rezeptor (NKG2D-Rezeptor, siehe 1.1.1.3).

Außerdem markieren verschiedene Proteinstrukturen die Zielzellen und machen sie somit für eine NK-Zell-Antwort empfindlich. Zum Beispiel wird die Apoptose, in Fas-Ligand tragenden Zellen, über Erkennung durch den Fas-Rezeptor eingeleitet [31]. Opsonisierte Zellen werden in ähnlicher Weise über Fc-Rezeptoren erkannt und eliminiert [32, 33]-[34].

Grundlegend gilt, dass erst ein Synergismus der AR ruhende NK-Zellen aktiviert und eine effiziente Zielzellerkennung ermöglicht [35]. Jedoch können die Signale der aktivierenden Rezeptoren durch solche inhibierender Rezeptoren (IR) ausgeschaltet werden [22]. Die IR tragen maßgeblich zur Unterscheidung von körpereigenen und körperfremden Strukturen bei. Dazu binden IR zumeist an MHC-I Moleküle, die sich auf der Zelloberfläche autologer Zellen befinden [36-38]. Zeigt eine Zelle, bedingt durch virale Infektion oder Mutation, veränderte oder in ihrer Anzahl reduzierte MHC-I-Moleküle, bleibt das IR-Signal aus. Es kommt daraufhin zur zytotoxischen Reaktion der NK-Zellen gegen die pathologisch veränderte Zielzelle. Somit sind körpereigene gesunde Zellen vor einem zytotoxischen Angriff der NK-Zellen geschützt. Dieses Prinzip wird als Modell des „fehlenden Selbst“ bezeichnet [39].

Im Menschen wird diese Funktion von einer Subgruppe der KIR-Rezeptoren oder dem CD94/NKG2A-Heterodimer übernommen [40, 41]. Zu den murinen IR gehört, neben einigen Ly49-Rezeptoren, ebenfalls das CD94/NKG2A-Heterodimer [42, 43]. Beide Gruppen sind ITIM-assoziiert [26, 36].

Nach Aktivierung der NK-Zellen erfolgt die Ausschüttung von Zytokinen [22]. Besonders bedeutsam sind NK-Zellen als Synthesequelle des Effektorzytokins INF- γ [44]. Nach Zellkontakt erfolgt zudem die Degranulation der konstitutiv vorhandenen Speichervesikel [44]. Dabei werden Perforin und Granzyme, eine Gruppe von Serinproteasen, ausgeschüttet. Perfo-

rin lagert sich mittels einer amphiphilen Domäne in die Membran der Zielzellen ein und bildet nach Polymerisation Poren-Komplexe aus [44, 45]. Die Granzyme treten u.a. durch diese Poren in die Zielzelle ein und setzen durch ihre proteolytische Aktivität eine zur Apoptose führende Kaskade in Gang [46]. Diese resultiert in der Fragmentierung der Zielzell-DNS, was zum unabwendbaren Zelluntergang führt [2].

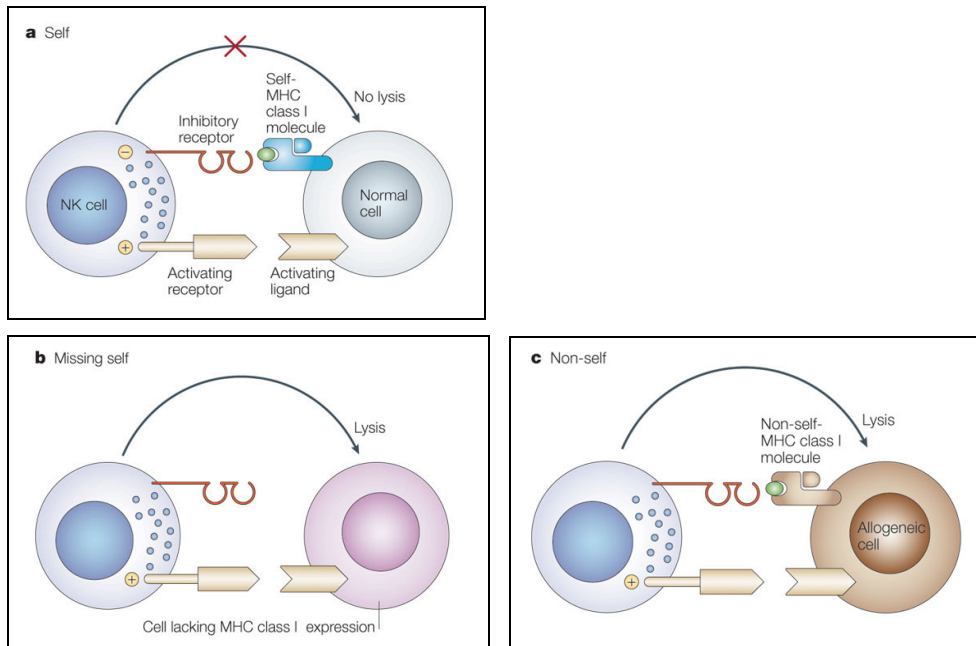


Abbildung 1: Hypothese des fehlenden Selbst; Abbildung nach Kumar et al. [47]

- Gesunde Zellen (*Self*) exprimieren Liganden der inhibitorischen Rezeptoren (IR). Durch diese adäquate Expression autologer MHC-Klasse-I-Moleküle werden körpereigene Zellen vor einer zytotoxischen NK-Zell-Antwort geschützt. Selbst wenn die körpereigenen Zellen Liganden aktivierender Rezeptoren tragen, überwiegt das negative Signal der IR.
- Kommt es, wie z.B. bei einer malignen Transformation, zum zellulären Verlust der MHC-Klasse-I-Expression spricht man vom „fehlendem Selbst“ (*Missing Self*). Der Liganden-induzierte Stimulus des inhibitorischen Rezeptors ist nicht mehr vorhanden. Es resultiert eine zytotoxische Reaktion der NK-Zellen durch ein Überwiegen der aktivierenden Signale.
- Allogen transplantierte Zellen (*Non Self*) zeichnen sich durch nicht körpereigene MHC-Klasse-I-Moleküle aus. Sie werden somit von NK-Zellen erkannt und eliminiert.

1.1.1.3 Der NKG2D-Rezeptor

Der *Natural-Killer Group 2 Member D* (NKG2D)-Rezeptor ist ein Homodimer, das auf reifen NK-Zellen, NK-Progenitoren, NKT-Zellen und einigen T-Zell-Subpopulationen vorhanden ist [48-51]. Die Kodierung erfolgt im *Natural-Killer Gene Komplex* (NKC) auf dem *Klrk1*-

Lokus, der im humanen Genom auf Chromosom 12 und im murinen Genom auf Chromosom 6 liegt [52].

Als Rezeptor der *Lectin-Like*-Gruppe hat NKG2D einen signifikanten modulatorischen Einfluss auf Immunantworten. So wurde seine Bedeutung bereits im Zusammenhang mit Autoimmunität, Transplantationsreaktionen, Abwehr von Tumoren und viral infizierten Zellen beschrieben [52, 53]. Da der NKG2D-Rezeptor schon auf NK-Progenitoren vorhanden ist und vermehrt in unreifen Zell-Stadien exprimiert wird, lässt sich ebenfalls eine Bedeutung in der NK-Zell-Entwicklung annehmen [54].

Der Rezeptorfunktion kommt jedoch auch im Rahmen der Tumorevasion eine bedeutende Rolle zu (siehe 1.2.3).

Der NKG2D-Rezeptor bindet diverse stressinduzierte Liganden, die u.a. auf vielen Tumorzelllinien und primären Tumorzellen vorkommen [49, 55-59].

Im humanen System werden so neben den Proteinen der ULPB-Familie auch die MHC-Klasse-I ähnlichen Proteine MIC-A und MIC-B, die bei Stress durch Hitze, Infektion oder Trauma exprimiert werden, erkannt [48, 58]. Im murinen System sind als Liganden H60, ein *Major-Histocompatibility*-Antigen, MULT-1, ein den humanen ULPB-Proteinen entsprechender Ligand, und die Mitglieder der Rae-1 Familie beschrieben worden [52, 57].

Die Transduktion des Rezeptorsignals erfolgt dabei über zwei *DNAX-Activating*-Proteine (DAP). Diese Adaptor-Moleküle sind DAP10 und das ITAM-assoziierte DAP12 [60, 61]. Des Weiteren enthält die Signalkaskade diverse Proteinkinasen, wie z. B. die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K).

Bei NK-Zell-Aktivierung kann der stimulierte NKG2D-Rezeptor die Zytokin-Sekretion und das Zellüberleben fördern. Zudem kommt es zu einer Kostimulation des adaptiven Immunsystems [51].

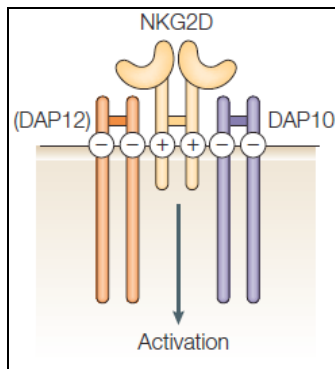


Abbildung 2: Der NKG2D-Rezeptor; Abbildung nach Raulet et al. [51]

Im transmembranen Segment enthält der Rezeptor geladene Aminosäuren. Über diese ist er mit den Adaptor-Proteinen DAP10 und DAP12 assoziiert.

1.1.2 ADAPTIVES IMMUNSYSTEM

Grundlegend unterscheidet sich das adaptive vom angeborenen Immunsystem durch eine selektive Reaktion gegen Antigene. Dabei unterliegt das adaptive Immunsystem den Grundsätzen der Antigen-Spezifität, der Diversität und der Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Geweben. Ein weiteres Charakteristikum ist die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, das bei erneutem Antigen-Kontakt eine schnelle Reaktivierung der Immunantwort zur Folge hat. Eine effektive Antwort der spezifischen Abwehr benötigt Antigen-präsentierende Zellen (APZ) und Lymphozyten. Als APZ fungieren dabei z. B. Makrophagen, Monozyten und DZ. Die lymphozytären zellulären Bestandteile der spezifischen Abwehr sind B- und T-Zellen.

B-Lymphozyten entstammen dem Knochenmark und besitzen Antigen-bindende Rezeptoren, die aus membranständigen Antikörpern bestehen. Der adäquate Stimulus einer B-Zelle ist die direkte Bindung ihres spezifischen Antigens. Dadurch ausgelöst kommt es zu einer schnellen Zellproliferation, die zum einen zur Entstehung von langlebigen Gedächtnis-B-Zellen und zum anderen zur Ausbildung von Antikörper-sezernierenden Plasmazellen führt. Die sezernierten Pathogen-spezifischen Antikörper sind Hauptbestandteil der humoralen Schiene der spezifischen Abwehr und tragen durch Opsonisierung von Zielzellen zur Vernetzung beider Arme des Immunsystems bei.

Auch T-Zellen entstammen dem Knochenmark, wandern aber zur Reifung in den Thymus ab. Es können zwei Haupttypen von T-Zellen, die unterschiedliche Funktionen erfüllen und durch charakteristische Korezeptoren gekennzeichnet sind, unterschieden werden. Für beide Typen gilt die spezifische Erkennung eines membranständigen Proteins namens *Major Histocompatibility Complex* (MHC) als adäquater Stimulus.

Dabei binden die $CD4^+$ -T-Helfer-Zellen (Th-Zelle) MHC-Klasse-II-Proteine, die exklusiv auf APZ vorkommen. Die Stimulation der Th-Zellen resultiert in der Produktion von Zytokinen. Durch diese Mediatoren werden diverse andere Zellen der angeborenen und spezifischen Immunität stimuliert. Dabei unterscheidet man zwischen Th1-Zellen, die sich v. a. durch die Produktion von IL-12 und $IFN-\gamma$ auszeichnen und mit der Aktivierung zytotoxischer Abwehrmechanismen assoziiert sind und, Th2-Zellen, die v. a. durch die Produktion der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 charakterisiert sind und die Sekretion humoraler Antikörper fördern. Hingegen erkennen $CD8^+$ -zytotoxische-T-Zellen (CTL) MHC-Klasse-I-Moleküle, die ubiquitär in allen kernhaltigen Zellen körpereigene Proteinfragmente präsentieren. Der zytotoxischen Aktivität der CTL kommt damit eine bedeutende Rolle in der Elimination von viral infizierten, tumorös entarteten und körperfremden Zellen zu.

Des Weiteren sind auch die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}), welche die Aktivität verschiedener Immunzellen supprimieren können, tumorimmunologisch von Bedeutung.

1.2 TUMORIMMUNOLOGIE

In gesunden Organismen ist eine Balance zwischen der von endogenen Stammzellen ausgehenden Zellproliferation und programmiertem, mittels Apoptose vermitteltem Zelltod von entscheidender Bedeutung. Bei Störungen dieser Homöostase kommt es zur Ausbildung von Neoplasien, die ein unkontrolliertes monoklonales Wachstum zeigen. Entziehen sich diese transformierten Zellen der Kontrolle des Immunsystems, besteht eine potenziell letale Bedrohung für den Organismus. Dabei sind, laut Todesursachenstatistik der WHO, maligne Tumoren weltweit die zweithäufigste Todesursache.

1.2.1 TUMORGENESE UND PROGRESSION

Grundlegend wird die Tumorentstehung als progressiver Prozess verstanden, bei dem eine Reihe von endogenen oder exogenen Stimuli zu einer Schädigung des zellulären Erbguts (DNA) führen. Aus dieser Entwicklung resultiert eine maligne Transformation der Zellen, die durch dynamische Genveränderungen und genetische Instabilität charakterisiert wird. Die progressive Veränderung hat die Ausbildung eines Tumors zur Folge. Dabei werden lokal begrenzte Tumoren als benigne bezeichnet. Im Gegensatz dazu stehen die progressiv invasiv wachsenden malignen Tumoren, die u.a. durch hämatogene oder lymphogene Aussaat von Metastasen charakterisiert sind. Hanahan und Weinberg beschrieben neun wichtige Schritte

der Genese und Progression von Tumoren, die in unterschiedlicher Reihenfolge oder parallel ablaufen können (siehe Tabelle 1) [62, 63].

Tabelle 1: Wichtige Schritte der Entstehung und Progression von Tumoren, nach Hanahan und Weinberg [62, 63]

Erworbene Fähigkeit des Tumors	Beispiel eines Mechanismus
Endogene Aktivität von Wachstumsfaktoren	Aktivierung des H-Ras Onkogens
Insensitivität gegenüber Wachstums-Suppressoren	Verlust des Retinoblastom-Suppressors
Umgehung der Apoptose	Produktion von IGF-Wachstumsfaktoren
Unlimitierte Replikation	Aktivierung der Telomerase
Neovaskularisation	VEGF-Produktion
Invasion von Gewebe und Metastasierung	Inaktivierung von E-Cadherin
Modulation des Energie-Metabolismus	Verstärkte Expression von GLUT1
Immunevasion	Sekretion von TGF- β
Ausbildung eines Mikromilieus	Freisetzung von CXCL12

1.2.2 IMMUNEVASION VON TUMOREN

Ein Großteil der entarteten Zellen und Mikrotumoren wird möglicherweise durch das Immunsystem erkannt und entfernt [63]. Bei der Ausbildung einer klinisch apparenten Tumorerkrankung liegt demnach ein Unterliegen des Immunsystems vor. Dies wird u.a. durch die Beobachtung einer erhöhten Tendenz zur malignen Entartung in immunsupprimierten Patienten erkenntlich [64, 65].

Sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem sind bedeutend für die Überwachung und Elimination von Tumoren. Diese Beobachtung konnte z. B. aus genetisch veränderten T- und NK-Zell-defizienten Mausmodellen, die mit stark erhöhter Tumorzinzidenz assoziiert waren, gewonnen werden [66].

Es konnten drei kritische Schritte der Evasion formuliert werden. Dabei spielen komplexe und reziproke Interaktionen der Tumoren und der Lymphozyten in jedem Stadium eine große Rol-

le [67]. Der erste Schritt postuliert ein Versagen der Eliminationsmechanismen des Immunsystems [68]. Als Konsequenz kommt es zum Persistieren von entarteten Zellen im Äquilibrium mit dem Abwehrsystem [68, 69]. In diesem Zustand der ständigen reziproken Beeinflussung kann zum einen die komplette Elimination des Tumors erfolgen [69]. Andererseits kann es zu einer phänotypischen Veränderung der Tumoreigenschaften, dem sogenannten „*Tumor-editing*“, kommen [70]. Die entstehenden, meist schwach-immunogenen Tumorvarianten, unterziehen sich der Kontrolle des Immunsystems und führen zu Progression, also zu unkontrollierbarem und infiltrativem Wachstum [70].

1.2.3 NK-ZELLEN IN DER TUMORIMMUNOLOGIE

In einer großen Kohortenstudie konnte gezeigt werden, dass eine reduzierte zytotoxische Aktivität der peripheren mononukleären Zellen, zu denen auch NK-Zellen gezählt werden, mit einem erhöhten Tumor-Risiko einhergeht [71]. Zusätzlich weisen aus Tumoren isolierte NK-Zellen gravierende funktionelle Einschränkungen auf. Der Nachweis dieser funktionsgestörten NK-Zellen ist daher, u. a. im humanen Kolorektal-Karzinom, mit einer schlechten Prognose für den Patienten vergesellschaftet [72-76].

Somit kommt den NK-Zellen, als Teil des angeborenen Immunsystems, bei der Tumorüberwachung eine große Bedeutung zu. Dabei sind sowohl die zytotoxische Funktion als auch die Bereitstellung von Zytokinen bedeutend. Nach momentanen Ansichten sind NK-Zellen wahrscheinlich v. a. in die Kontrolle und Elimination von entarteten Zellen, kleinen Tumoren und Mikrometastasen involviert.

Das sehr komplexe und sensitive Regulationssystem unterliegt im Rahmen der Tumorprogression vielen funktionellen Veränderungen [72, 77]. Diesbezüglich wurden viele, die NK-Zell-Aktivität einschränkende Evasionsmechanismen beschrieben.

So haben einige Tumoren die Fähigkeit, Fas-Liganden oder immunsuppressive Proteine wie z. B. TGF- β zu sezernieren und die NK-Zellen damit zu inhibieren oder zur Apoptose zu bringen [78].

Bezüglich des NK-Zell-Rezeptors NKG2D wurden mehrere Evasionsmechanismen beschrieben. Zum einen führten die Retention des NKG2D-Liganden im intrazellulären Kompartiment sowie die Sekretion einer löslichen Form des Liganden zu einer gestörten Rezeptor-Funktion [49, 79]. Außerdem konnte in Viren die Expression von Proteinen, die ihrerseits die Expression von NKG2D-Liganden negativ beeinflussen, beobachtet werden [80, 81].

Ein weiterer Evasionsmechanismus wurde für viral infizierte Zellen, die normalerweise auf

Grund einer niedrigen MHC-Klasse-I-Expression von NK-Zellen erkannt und lysiert werden, beschrieben. Um einer zytotoxischen Immunantwort zu entgehen, werden hierbei inhibitorische NK-Zellrezeptoren moduliert. So können z. B. mit humanem Zytomegalievirus infizierte Zellen die Expression von endogenem HLA-E, einem Liganden des inhibitorischen NKG2A-Rezeptors, vermehren [82].

Auch das im Tumor vorherrschende Mikromilieu hat einen Einfluss auf die Zellfunktion. Dabei können zum einen die vorherrschenden physikalisch-chemischen Bedingungen wie Hypoxie, Azidose und Hypoglykämie die NK-Zellen in ihrer Funktion reduzieren. Zum anderen können auch Treg-Zellen und ein Überwiegen von Th2-Zytokinen die Zellen supprimieren.

1.3 DAS B-ZELL-LYMPHOM ALS MODELLTUMOR

1.3.1 DAS BURKITT-LYMPHOM IM HUMANEN ORGANISMUS

Benannt nach dem Erstbeschreiber wird das Burkitt-Lymphom zu den Non-Hodgkin-Lymphomen der B-Zell-Reihe gezählt [83]. Im Blutaussstrich zeigt sich eine hohe Anzahl lymphozytärer Blasten, die sich durch eine sehr hohe Proliferationsrate auszeichnen [84]. Bei Kindern tritt das Lymphom endemisch in Afrika auf und ist zu 95% mit einer Epstein-Barr-Virus-Infektion (EBV) assoziiert. Außerdem wird ein sporadisches Burkitt-Lymphom beschrieben, welches nur zu 20% mit einer EBV-Infektion einhergeht. Bei Erwachsenen geht das Auftreten meist mit erworbenen Immundefizienzen, wie z. B. HIV oder Malaria, einher. Bei allen Formen wurde eine durch genetische Translokationen bedingte, konstitutive Aktivierung des *c-myc*-Protoonkogens beschrieben [85].

Auf Grund der hohen Zell-Proliferationsgeschwindigkeit ist das Lymphom therapiesensitiv gegenüber einer intensiven Chemotherapie und hat somit eine relativ gute Prognose.

1.3.2 DAS BURKITT-LYMPHOM IM MURINEN SPONTANLYMPHOM

Im verwendeten Mausmodell wird das *c-myc*-Protoonkogen unter der Kontrolle der B-Zellspezifischen regulatorischen Sequenz der Immunglobulin-Leichtkette λ heterozygot exprimiert. Die *c-myc*-transgenen Mäuse entwickeln spontan ein vom primären lymphatischen Gewebe ausgehendes Lymphom der B-Zell-Reihe. Dieses ähnelt in der Morphologie dem humanen Burkitt-Lymphom. So konnte u. a. in der Histologie das typische Sternenhimmel-Bild der Lymphknoten beobachtet werden [86].

1.4 AUFGABENSTELLUNG

Für die synergistische Aktivierung ruhender NK-Zellen wird allgemein ein sequenzielles Modell angenommen. Dabei etablierten North *et al.* durch *in vitro* Versuche eine Zwei-Schritt-Hypothese, die einen präaktivierenden stimulierenden Schritt (*Priming*) und einen sekundären auslösenden Schritt (*Triggering*) umfasst [87]. Als vorbereitende Schritte im Sinne des *Primings* wurden u.a. die Stimulation mit IL-2, IL-15 und die Interaktion mit DZ beschrieben [11, 87, 88]. Die Stimulation über Natürliche Zytotoxizitäts-Rezeptoren (NZR) konnte dagegen als auslösender Schritt definiert werden [87]. Brenner *et al.* zeigten im *c-myc*-transgenen Spontanlymphom-Modell, dass es sich bei dem durch das NKG2D-System vermittelte Signal um ein sekundär aktivierendes handeln muss, welches die Auslösung der Zytotoxizität zur Folge hat [89]. Anlass zu dieser Aussage war u.a. die Beobachtung einer Tumorevasion bei Blockade der Liganden des NKG2D-Rezeptors durch ein Multimer [88, 89].

Bisher wurde die Bedeutung des NKG2D-Rezeptor-Liganden-Systems diesbezüglich kontrovers diskutiert. So beschrieben z.B. Pende *et al.* eine präaktivierende Funktion des NKG2D-Rezeptors, die sich lediglich synergistisch zur Aktivierung über NZR verhält [90]. Auch Guerra *et al.* konnten in ihrem NKG2D-Rezeptor-defizienten Mausmodell eine noch erhaltene zytotoxische Aktivität der NK-Zellen gegenüber Tumorzellen, die in ihrer MHC-Klasse-I-Expression reduziert waren, erkennen [91]. Jamieson *et al.* vermuteten hingegen eine direkt aktivierende Funktion des Rezeptors [50].

Des Weiteren beschrieben Brenner *et al.* den Zustand der „aktivierungsinduzierten Erschöpfung“ der NK-Zellen im *c-myc*-transgenen Spontanlymphom-Modell. Dieser dysregulierte Zustand war in Tumor-NK-Zellen gekennzeichnet durch einen aktivierten Phänotyp bei gleichzeitigen funktionellen Einschränkungen [73, 89]. Neben der Hochregulation der Marker CD69 und CD45R wies auch die von Przewoznik *et al.* gezeigte vermehrte Expression des Degranulationsmarkers CD107a auf Tumor-NK-Zellen auf eine stattgefundenen Aktivierung hin [92]. Funktionell wurde im autochthonen Lymphom sowohl eine Suppression der Produktion von IFN- γ als auch der Verlust der zytotoxischen Aktivität festgestellt [73].

Verschiedene Überlegungen ließen eine ursächliche Beteiligung des NKG2D-Rezeptors an der Entstehung dieser Anergisierung vermuten. Zum einen konnte eine bis zu zehnfache Erhöhung der stressinduzierten NKG2D-Liganden auf Zellen früher Tumorstadien wahrscheinlich mit einer anfänglichen Aktivierung und Degranulierung der NK-Zellen in Verbindung gebracht werden [73]. Zum anderen ist bekannt, dass eine chronische Interaktion des NKG2D-Rezeptors mit seinen Liganden zu einer Internalisierung des Rezeptors und damit zu

einer Tumorevasion führen kann [49, 93]. Dies könnte sowohl die Abnahme des Rezeptors auf NK-Zellen des Spontanlymphoms als auch den Verlust der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen bei Tumorprogression erklären.

Um eine mögliche Beteiligung des sekundär aktivierenden NKG2D-Rezeptors an der Entstehung der „aktivierungsinduzierten Erschöpfung“ zu untersuchen, wurde ein NKG2D-Rezeptor-defizientes Spontanlymphom-Modell, welches das Protoonkogen *c-myc* unter Kontrolle der regulatorischen Sequenz der Immunglobulin-Leichtkette λ exprimiert, eingeführt. Zur Einführung dieses Modells wurden folgende konkrete Fragen formuliert:

- Werden die NK-Zellen in den tumortragenden Tieren aktiviert?
- Kommt es im Tumormilieu zur „aktivierungsinduzierten Erschöpfung“ der IFN- γ -Produktion?
- Bleibt die zytolytische Funktion der NK-Zellen erhalten?
- Ist die Tumorüberwachung durch NK-Zellen eingeschränkt?
- Welche Aussagen können bezüglich des sequenziellen Aktivierungs-Modells, bei Fehlen eines sekundär auslösenden Schrittes, gemacht werden?
- Ergeben sich Hinweise auf mögliche immuntherapeutische Ansätze im NKG2D-System?

2 Materialien und Methoden

2.1 MATERIALIEN

2.1.1 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

Gerät/ Material	Hersteller
Brutschrank Hera Cell 240	Heraeus Instruments, Hanau
Durchflusszytometer LSR-II	Becton Dickinson, Heidelberg
Einfrierbox „Mr. Frosty“	Nunc, Langenselbold
Einmalpipetten (5,10 und 25 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Eisbad	Neolab, Heidelberg
FACS-Röhrchen (klein)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Heizblock DRI-Block DB2A	Techne, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Kryoröhrchen (1 und 1,8 ml)	Nunc, Wiesbaden
Lichtmikroskop Leica DMIL	Leica Microsystems, Heidelberg
Light-Cycler (Gerät, Kapillaren)	Roche, Mannheim
LumaPlate™-96	Canberra Packard, Dreieich
MACS-Zelltrennsystem (Säulen, Beads)	Miltenyi, Biotec, Bergisch Gladbach
Mehrkanalpipette	Brand, Weinheim
Mehrlochplatten	Becton Dickinson, Heidelberg
Milli-Q®-Reinwasserherstellungssystem	Millipore, Schwalbach
Multistepper-Pipette	Eppendorf, Hamburg
Nanodrop Spectrometer	Peqlab, Erlangen
Petrischalen (94 x 16 mm)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipetten	Gilson, Limburg
Pipettenspitzen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (1,0 und 1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen (15 und 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen

Stickstofftank	Air liquide, Düsseldorf
Szintilationsmessgerät TOPCount	Canberra Packard, Dreieich
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zählkammer Neubauer-Improved	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Zellkulturflaschen (250 und 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellsiebe (40 µm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellsortiersystem FACS Aria III	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifuge, biofuge pico	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge, Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments, Hanau

2.1.2 REAGENZIEN/CHEMIKALIEN

Name	Hersteller
Brefeldin A	eBioscience, Frankfurt
1-Brom-3-Chlor-Propan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chrom-51 (185 mBq)	Hartmann Analytic, Braunschweig
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA	Merck, Darmstadt
Formaldehyd 37%	Carl Roth, Karlsruhe
FKS	Invitrogen, Karlsruhe
Ionomycin (Calcium-Salz)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IC-Fixation Puffer	Becton Dickinson, Heidelberg
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Murines IL-15	PeproTech, Hamburg
10x Permeabilization Puffer	eBioscience, Frankfurt
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proleukin®S (IL-2, human)	Novartis, Nürnberg
PBS	Invitrogen, Karlsruhe

Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Salzsäure (1 M)	Merck, Darmstadt
TRIReagent™	Biozol, Eching
Trypanblau	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.3 VORGEFERTIGTE ZELLSEPARATIONS- UND ANALYSESYSTEME

MACS-Kit:

NK cell Isolation Kit I
 NK cell Isolation Kit II
 Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Luminex-Anwendungen:

Bio-Plex™ Pro Mouse Cytokine Th1/Th2 Panel
 BioRad, München

2.1.4 ZELLKULTURMEDIEN UND PUFFER

Medium	Zusammensetzung
Basismedium	RPMI 1640 ohne L-Glutamin 5 % hitzeinaktiviertes FKS 100 U/ml Penicillin-G-Natrium 100 µg/ml Dihydrostreptomycinsulfat 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 5 ml nichtessentielle Aminosäuren (100x) 50 µM 2-Mercaptoethanol
Stimulationsmedium	Basismedium mit 10 % hitzeinaktiviertem FKS
Einfriermedium	90% hitzeinaktiviertes FKS 10 % DMSO
Lysepuffer (pH 7,4)	8,25 g NH ₄ Cl 1,00 g K ₂ HCO ₃ 37 mg Na-EDTA H ₂ O (dest.) ad 100 ml

FACS-Puffer

PBS mit
2 % hintzeinaktiviertem FKS
2 mM EDTA
1 % Natriumazid

2.1.5 ANTIKÖRPER UND MULTIMERE

2.1.5.1 Antikörper für Messungen am Durchflusszytometer

Tabelle 2: Für die Durchflusszytometrie verwendete monoklonale Antikörper.

Antigen	Klon	Isotyp	Fluorochrom	Hersteller
CD3e	145-2C11	Hamster IgG1, κ	PE	BD Pharmingen
CD3	17A2	Ratte IgG2b, κ	PE-Cy5	BD Pharmingen
CD3ζ	G3	Maus IgG2a, κ	FITC	AbDSerotec
CD4	RM4-5	Ratte, IgG2a	PerCP	BD Pharmingen
CD8a	53-6.7	Ratte, IgG2a	eFluor450	eBiosciences
CD11b	M1/70	Ratte IgG2b, κ	Pacific Blue	BioLegend
CD19	1D3	Ratte, IgG2a	V450	BD Pharmingen
CD27	LG.7F9	Hamster, IgG	Biotin	eBiosciences
CD45R/B220	RA3-6B2	Ratte IgG2a, κ	PerCP	BD Pharmingen
CD69	H1.2F3	Hamster IgG1, λ3	PE-Cy™ 7	BD Pharmingen
CD107a	1D4B	Ratte IgG2a, κ	FITC	BioLegend
IFNγ	XMG1.2	Ratte IgG1 κ	APC	BioLegend
NK1.1	PK136	Maus IgG2a, κ	APC	BD Pharmingen
NK1.1	PK136	Maus IgG2a, κ	PE	BD Pharmingen

2.1.5.2 Multimere

Das verwendete NKG2D-Tetramer wurde dankenswerterweise von Dirk Busch (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Technische Universität München) zur Verfügung gestellt. Zur Färbung wurde das PE-konjugierte Multimer in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Die Färbe- und Vermessungsprozedur entsprach der einer oberflächlichen FACS-Färbung.

2.1.6 SOFTWARE

Für die Auswertung der am Durchflusszytometer generierten Daten wurde die aktuelle Version des Programms FlowJo (Firma Treestar Inc. aus Ashland, OR, USA) verwendet. Die Abbildungen wurden mit Prism5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) erstellt, weitere Bearbeitungen erfolgten mit Adobe Illustrator CS5 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA). Zusätzlich wurde Microsoft Office (Microsoft, Redmond, WA, USA) verwendet.

2.2 METHODEN

2.2.1 ZELLKULTUR

2.2.1.1 Allgemeine Arbeits- und Kultivierungsbedingungen

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden sämtliche Arbeiten unter sterilen Bedingungen unter der Werkbank durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C Temperatur, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit.

2.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Zellaliquots wurden zur dauerhaften Lagerung bei -196 °C in Flüssig-Stickstofftanks asserviert. Hierzu wurden die Proben in Einfriermedium, welches ein nicht-schädigendes Herunterkühlen ermöglicht, suspendiert und zunächst schonend auf -80 °C temperiert. Anschließend wurden sie in den Stickstofftank überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen in 37 °C warmem Basismedium oder PBS zügig resuspendiert, gewaschen und gezählt. Danach wurden sie entweder in Kultur überführt oder für FACS-Färbungen verwendet. Die Lebendzellzahl wurde mittels der Trypanblau-Exklusions-Methode, unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer und eines Lichtmikroskops, ermittelt.

2.2.1.3 Verwendete Zelllinien

Für die Experimente wurden folgende murine Tumor-Zelllinien verwendet.

Tabelle 3: In den Experimenten verwendete murine Zelllinien.

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
A20	B-Zell-Lymphomlinie, von einem Retikulosarkom abgeleitet (Typ B nach Dunn-Klassifikation)	[Kim <i>et al.</i> 1979]
RMA	T-Zell-Lymphomlinie	
RMA-S	T-Zell-Lymphomlinie, von RMA-Zelllinie abgeleitet	
YAC-1	T-Zell-Lymphomlinie, durch Infektion mit Moloney-Leukämie-Virus (MLV) gewonnen	[Kiessling <i>et al.</i> 1975] [Piontek <i>et al.</i> 1985]
291	B-Zell-Lymphomlinie, aus <i>c-myc</i> -transgenen Tieren generiert	Generiert im Labor von A.Gerbitz

2.2.2 TIERMODELL UND TIERVERSUCHE

Sämtliche Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt und unter strenger Beachtung des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Alle in den Untersuchungen für diese Arbeit verwendeten Mäuse wurden auf einem CB57BL/6-Hintergrund generiert oder als solche selbst als Wildtyp-Kontrolle verwendet. Die C57BL/6-Mäuse wurden von der Firma Taconic (Ry, Dänemark) bezogen und nach 14-tägiger Quarantäne unter spezifisch-pathogen-freien Bedingungen im Tierstall des Instituts für Molekulare Immunologie gehalten.

2.2.2.1 Präparation von Milz-und Lymphknotenzellen

Die Organentnahme erfolgte, nachdem die Mäuse in einer CO₂-Athmosphäre abgetötet und mit 80%igem Ethanol oberflächlich desinfiziert wurden, unter sterilen Bedingungen. Es wurden neben der Milz die axillären, inguinalen und mandibulären Lymphknoten entnommen. Die Organe wurden dann in Medium unter Zuhilfenahme von Zellsieb, Spritze und Stempel in eine homogene Zellsuspension überführt. In weiteren Arbeitsschritten wurden die Zellen gewaschen, die Erythrozyten lysiert und die Lebendzellzahl bestimmt. Anschließend wurden die gewonnenen Proben ihrem jeweiligen Verwendungszweck zugeführt.

2.2.2.2 Gewinnung von Blutproben und Seren

Die Blutabnahme erfolgte bei getöteten Mäusen entweder aus der Vena cava inferior oder durch direkte Punktion des Ventriculus dexter. Nachfolgend wurden die Proben gekühlt, zentrifugiert, und das Serum wurde in gesonderte Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden bei -20 °C konserviert.

2.2.2.3 Generierung von Zellüberständen

Zur Untersuchung der Zellüberstände wurden je 1×10^6 Zellen für 18 Stunden in 200 µl Stimulationsmedium inkubiert. Daraufhin wurden 150 µl des Überstandes in ein Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.2.4 Tabellarische Listung der verwendeten Spendertiere

Tabelle 4: Genotypen der verwendeten Spendertiere

Spendertier	Expression des <i>c-myc</i> -Onkogens	Knock-out des NKG2D-Rezeptors	Spontane Lymphomentwicklung
Wildtyp (C57BL/6)	Nein	Nein	Nein
<i>c-myc</i> ^{-/+}	Ja	Nein	Ja
NKG2D ^{-/-} <i>c-myc</i> ^{-/-}	Nein	Ja	Nein
Klinisch inapparente NKG2D ^{-/-} <i>c-myc</i> ^{-/+}	Ja	Ja	Ja, aber noch keinerlei klinische Erkrankungszeichen bei Abtötung
Tumor-tragende NKG2D ^{-/-} <i>c-myc</i> ^{-/+}	Ja	Ja	Ja

2.2.3 DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS-FÄRBUNGEN)

Mittels der auf einer Lasertechnologie basierenden Zellanalysemethoden können spezifische Eigenschaften einzelner Zellen untersucht werden. Dazu werden Zell-Suspensionen mit spezifischen zytochromkonjugierten Antikörpern inkubiert und schließlich einzeln, in einem Puffer suspendiert, an verschiedenfarbigen Lasern vorbeigeführt. Das Gerät misst die Intensität der jeweiligen Fluoreszenzen. Dies ermöglicht dem Experimentator, in der darauffolgenden Auswertung, z.B. die quantitative Bestimmung der Oberflächenbeschaffenheit oder des intrazellulären Proteingehaltes.

2.2.3.1 Färbung von Zellsuspensionen zur Analyse am Durchflusszytometer

Die zu analysierenden Zellen wurden gewaschen und anschließend 30 Minuten bei 4 °C mit Antikörpern in FACS-Puffer in Dunkelheit inkubiert. Dabei wurden entweder 1×10^6 Zellen mit 50 µl, oder 2×10^6 Zellen mit 100 µl Antikörperlösung versehen. Die optimalen Verdünnungen der jeweiligen Antikörper wurden entweder vom Hersteller angegeben oder mit Hilfe einer Verdünnungsreihe ermittelt. Nach der Inkubationszeit wurden die für reine Oberflächenfärbungen vorgesehenen Proben gewaschen und zur Messung am Zytometer in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert. Gegebenenfalls wurden Proben mit 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Wurden auch intrazelluläre Proteine gefärbt, schlossen sich weitere Schritte an. Zunächst wurden die Zellen unter Zugabe von 100 µl Fixierungspuffer und folgender halbstündiger Inkubation fixiert. Danach wurden sie durch zweimaliges Waschen mit einem speziellen Puffer permeabilisiert. Beide Lösungen wurden als „Fixation & Permeabilization Kit“ bei der Firma eBioscience erworben. Nun folgte ein weiterer Färbeschritt mit dem zur intrazellulären Markierung vorgesehenen Antikörper. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen ebenfalls zur Vermessung am Zytometer in FACS-Puffer aufgenommen.

Für die Markierung wurden die unter 2.1.5.1 aufgezählten Antikörper verwendet. Bei Färbung des intrazellulär vorliegenden Proteins IFN- γ wurden die Zellen zunächst 4 Stunden mit Stimulationsmedium, dem PMA/Ionomycin und Brefeldin A in einer Verdünnung von 1:1000 zugesetzt waren, im Brutschrank inkubiert. Zur Tod-Lebend-Unterscheidung nichtfixierter Zellen wurde kurz vor der Vermessung der Proben am Durchflusszytometer Propidiumjodid zugegeben.

2.2.3.2 Messungen am Durchflusszytometer und Auswertung der Daten

Die Proben wurden am LSR-II-Zytometer der Firma Becton Dickinson vermessen. Dazu wurde die Software FACSDiVa verwendet. Für die Auswertung wurde die FlowJo-Software verwendet. Es wurden lediglich einzelne lebende Zellen bei der Auswertung berücksichtigt. Die Abgrenzung der NK-Zellen erfolgte, falls nicht anders angegeben, stets als NK1.1-positive und CD3-negative Subpopulation.

2.2.4 IMMUNMAGNETISCHE ZELLSEPARATION (MACS)

Um hochreine Populationen an NK-Zellen zu erhalten, wurden diese, unter Verwendung der „NK cell isolation Kits I/II“ der Firma Miltenyi, von den nicht erwünschten Zellen separiert. Hierzu wurden die Milzen mehrerer Versuchstiere vereinigt. Alle weiteren Schritte erfolgten nach den Angaben des Herstellerprotokolls.

Als Grundlage der magnetischen Zellseparation dient die Markierung der nicht erwünschten Zellen mit Antikörpern und daran gekoppelten magnetischen Partikeln. Die so teilweise markierten Zellen werden in MACS-Puffer resuspendiert. Anschließend werden sie in Säulen gegeben, die sich in einem starken Magnetfeld befinden. Durch die Einwirkung des Magnetfeldes wird die Passage der nicht erwünschten Zellen verhindert. Es resultiert eine hochreine Zellsuspension der erwünschten Zellen. Die Reinheit der Zellsuspension betrug zwischen 85 und 95 % und wurde durchflusszytometrisch ermittelt (siehe Abbildung 3).

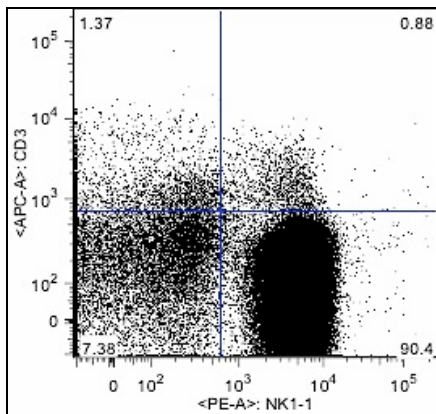


Abbildung 3: Reinheit der isolierten NK-Zell-Population nach MACS-Separation.

Der Prozentanteil der NK1.1⁺CD3⁻-Zellen wurde durchflusszytometrisch gemessen.

2.2.5 IN-VITRO-KOKULTUR

Um den unmittelbaren Einfluss von Tumorzellen auf NK-Zellen *ex vivo* zu untersuchen, wurde eine Kokultur von Tumorzellen der Zelllinie 291 mit NK-Zellen etabliert. Dazu wurden $0,5 \times 10^6$ mittels MACS-Zell-Separation angereicherte NK-Zellen mit 4×10^6 291-Tumorzellen für 18 Stunden im Brutschrank koinkubiert. Als Medium wurde Stimulationsmedium verwendet, dem IL-2 (30 U/ml) und IL-15 (50 ng/ml) zugesetzt wurde. Als Kontrolle wurden die Zellen in Medium ohne Tumorzellen gegeben. Nach der 18-stündigen Inkubation wurden PMA/Ionomycin und Brefeldin A (jeweils in einer Verdünnung von 1:1000) für 4 Stunden zugefügt. Danach erfolgten Färbungen zur Vermessung der Proben mittels FACS.

2.2.6 ZYTOTOXIZITÄT DER NK-ZELLEN

Die Fähigkeit der NK-Zellen NKG2D-Rezeptor-defizienter Mäuse, potenzielle Zielzellen zu erkennen und zu lysieren, wurde in einem Chrom-Freisetzungsversuch untersucht.

Als Zielzellen wurden YAC-1-Zellen verwendet, die aufgrund einer niedrigen MHC-I-Expression und einer hohen Expression von NKG2D-Liganden von NK-Zellen erkannt und getötet werden. Zur radioaktiven Markierung wurden YAC-1-Zellen für 1,5 Stunden mit 50 μCi $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ in hitzeinaktiviertem FKS inkubiert. Die benötigte Menge an Radioaktivität wurde tagesgenau ermittelt. Dazu wurde die Zerfallsgleichung unter Berücksichtigung der Halbwertszeit von ^{51}Cr ($t_{1/2} = 27,7\text{d}$) angewendet. Anschließend wurden die Zielzellen zu den in verschiedenen Konzentrationen vorgelegten Effektor-NK-Zellen gegeben. Dazu wurden die Zellen in Stimulationsmedium aufgenommen. Nach einer weiteren vierstündigen Inkubation wurden 50 μl der jeweiligen Überstände auf eine Luma-Platte übertragen und über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag erfolgte die Auslesung der freigesetzten Radioaktivität mittels eines γ -Szintillationszählers. Zur Ermittlung der prozentualen Lyse der Zielzellen wurde folgende Formel verwendet:

$$\% \text{ Lyse} = \frac{\text{Spezifische Freisetzung} - \text{Unspezifische Freisetzung}}{\text{Maximale Freisetzung} - \text{Unspezifische Freisetzung}} \times 100 \%$$

2.2.7 ERMITTLUNG DES ZYTOKINPROFILS MITTELS BIOPLEX-METHODE

Um das Zytokinmilieu in Überständen zu untersuchen, wurde das Bioplex-Verfahren der Firma Luminex Corp. angewendet. Jeder Analyt wird dabei mit Hilfe spezifisch gefärbter Polyesterolosphären gemessen. Die Mikrosphäre bindet das Substrat, welches wiederum im folgenden Schritt mit einem Fluoreszenz-konjugierten Detektions-Antikörper versehen wird. Somit können in der sich anschließenden Messung die Substanzen eindeutig detektiert und mittels einer Standardkurve quantifiziert werden.

Die Angaben des Herstellerprotokolls wurden befolgt. Es wurden stets Duplikate der Proben gemessen. Die Messung erfolgte am Bio-Plex-Auslesegerät.

2.2.8 DNS-EXKTRAKTION UND POLYMERASE-KETTENREAKTION

Zur Extraktion von DNS wurden ca. 5mm lange murine Schwanzstücke über Nacht in Lyse-puffer (100mM Tris HCL pH 8,5, 5mM EDTA, 0,2% SDS, 200mM NaCl) und Proteinase K bei 56°C inkubiert. Nach Fällung der Proteine mit gesättigtem NaCl (> 5M) wurde die DNA unter Zugabe von 100%-tigem Isopropanol präzipitiert. Nach Waschen mit Ethanol (70%) und Aufnahme in Tris-EDTA wurden die Proben eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Die dadurch vollständig gelöste DNS wurde für die Genotypisierung sofort in der PCR eingesetzt oder bei -20°C aufbewahrt.

Die PCR erfolgte unter Verwendung der jeweiligen Primer (Metabion, Planegg), einer Taq-DNA-Polymerase (Invitrogen, Darmstadt), dNTPs (Invitrogen, Darmstadt), MgCl₂ und Reaktionspuffer. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Fragmente nach Größe im 2%-igen Agarosegel unter Zusatz von Ethidiumbromid und unter Verwendung von Ladepuffer (Fermentas, Schwerte) und einer DNS-Kilobasen-Leiter (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Fermentas, Schwerte). Die Laufzeit betrug ca. 45 Minuten bei einer Spannung von 80 Volt.

Tabelle 5: Primer der Firma Metabion, die bei der RT-PCR verwendet wurden.

Primer	Richtung	Sequenz
hmyc E2	vorwärts	5'-GCT CGT CTC AGA GAA GCT GG-3'
hmyc 12	rückwärts	5'-ATC TCT CCA GAT CTG CTA TCT C-3'
Myc B29-18F	vorwärts	5'-GTG GCA CGG AAC TTC TAG TC-3'
Myc B29-9R	rückwärts	5'-CTT GTC AAG TAG CAG GAA GA-3'
NKGFPS	vorwärts	5'CAT AAA GTC CGC TTT GAT GTT A -3'
NKGFPA1	rückwärts	5'ATG AAC TTC AGG GTC AGC TT -3'
NKGFPA2	rückwärts	5'GCA GAT TCC CAA AAT TCT TG -3'

3 Ergebnisse

3.1 EINFÜHRUNG DES MODELLORGANISMUS

3.1.1 STAMMBAUM

Zafirova *et al.* beschrieben 2009 erstmals NKG2D-Rezeptor-defiziente Mäuse [94]. Diese wurden durch Vektor-vermittelte Disruption von Exons im *Klrkl*-Lokus und anschließender Kreuzung erzeugt [94]. Noch im gleichen Jahr wurden die Mäuse am Helmholtz-Institut für Molekulare Immunologie in der Arbeitsgruppe Mocikat rederivatisiert, homozygotisiert und anschließend mit *c-myc*-transgenen Tieren verpaart.

Die Stammbäume des Kreuzungsvorgangs sind in den Abbildungen 4 bis 6 dargestellt.

Es wurde damit erstmals ein NKG2D-Rezeptor-defizientes Maus-Modell eingeführt, bei dem es, durch konstitutive Überexpression des humanen Protoonkogens *c-myc*, zur autochthonen Genese eines B-Zell-Lymphoms kommt. Dabei steht das Protoonkogen unter der Kontrolle der regulatorischen Sequenz der Immunglobulin-Leichkette λ . Die Tiere entwickelten mit einer Frequenz von 100% ein Lymphom, das klinisch dem humanen Burkitt-Lymphom entspricht [85].

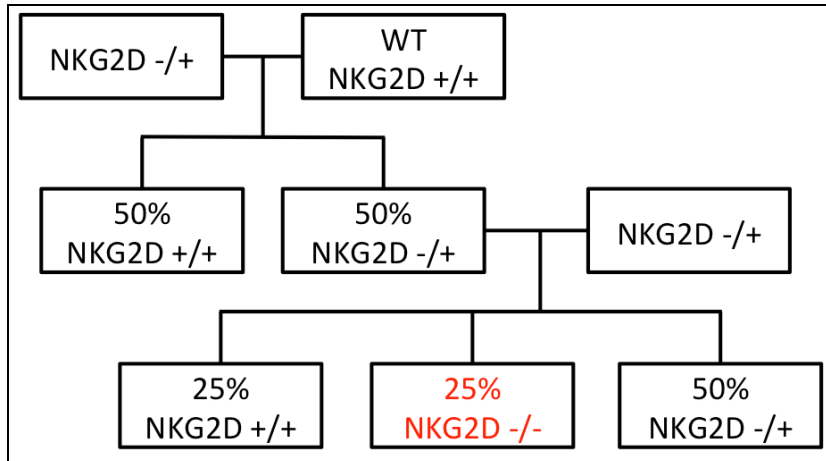


Abbildung 4: Homozygotisierung NKG2D-Rezeptor-defizienter Mäuse

Nach einer ersten Paarung mit einem Wildtyp wurden heterozygote Tiere verpaart. Ein Viertel der resultierenden Nachkommen ist NKG2D-defizient.

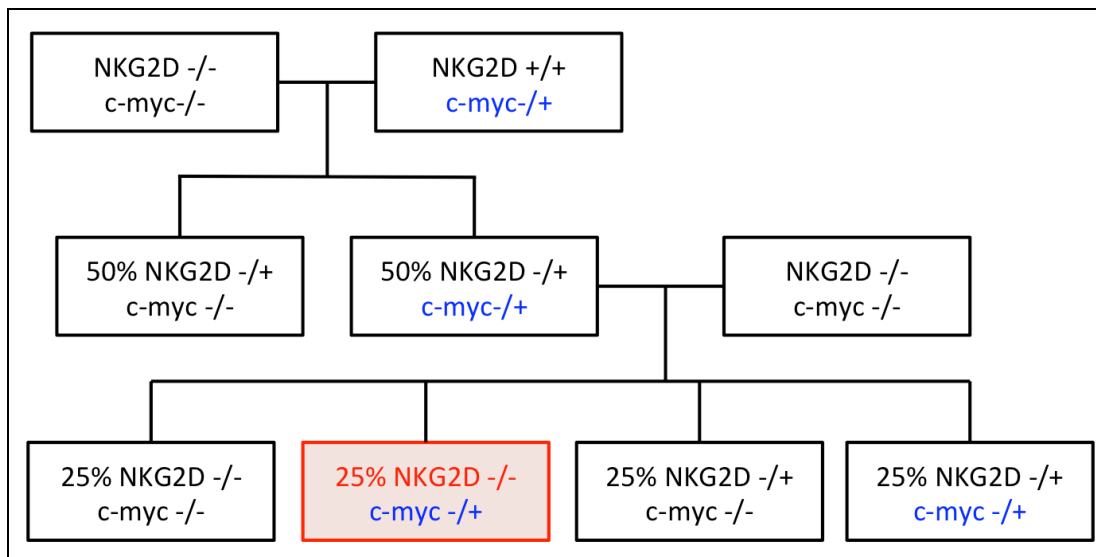


Abbildung 5: Einkreuzung des *c-myc*-Allels.

Im nächsten Schritt wurden NKG2D-defiziente Tiere mit *c-myc*-transgenen Heterozygoten verpaart. Durch eine weitere Verpaarung mit NKG2D-defizienten Tieren resultieren zu 25% NKG2D-Rezeptor-defiziente *c-myc*-transgene Mäuse (rot hinterlegtes Rechteck). Diese Tiere entwickeln spontan ein B-Zell-Lymphom, welches klinisch dem humanen Burkitt- Lymphom gleicht.

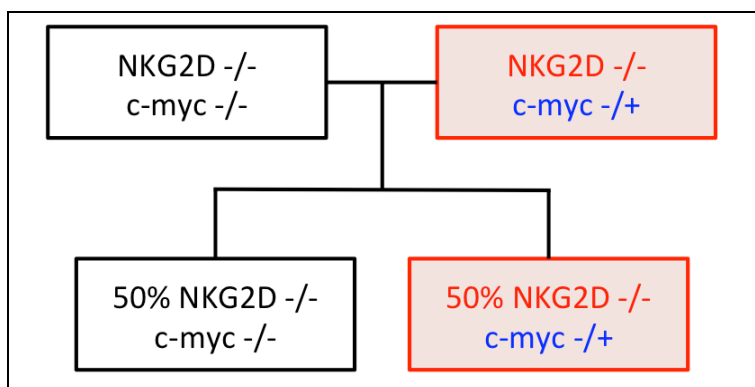


Abbildung 6: Erhaltungszucht von NKG2D-Rezeptor-defizienten *c-myc*-transgenen Mäusen.

Für die Erhaltung des NKG2D-defizienten Spontanlymphom-Modells wurden NKG2D-defiziente Tiere, die sich bezüglich der Expression des *c-myc*-Protoonkogens unterscheiden, miteinander verpaart.

3.1.2 BESTIMMUNG DES GENOTYPEN

Alle Tiere wurden von Albert Geishauser (Institut für Molekulare Immunologie, München) bezüglich der Expression des *c-myc*-Protoonkogens und des NKG2D-Rezeptors mittels PCR genotypisiert (siehe Abbildung 7). Durchflusszytometrisch wurde neben dem Fehlen des NKG2D-Rezeptors gezeigt, dass weitere NK-Zell-Rezeptoren wie z.B. NKp46 oder CD94 auf NKG2D-Rezeptor-defizienten Mäusen nicht beeinträchtigt sind (N. Hömberg, mündliche Mitteilung).

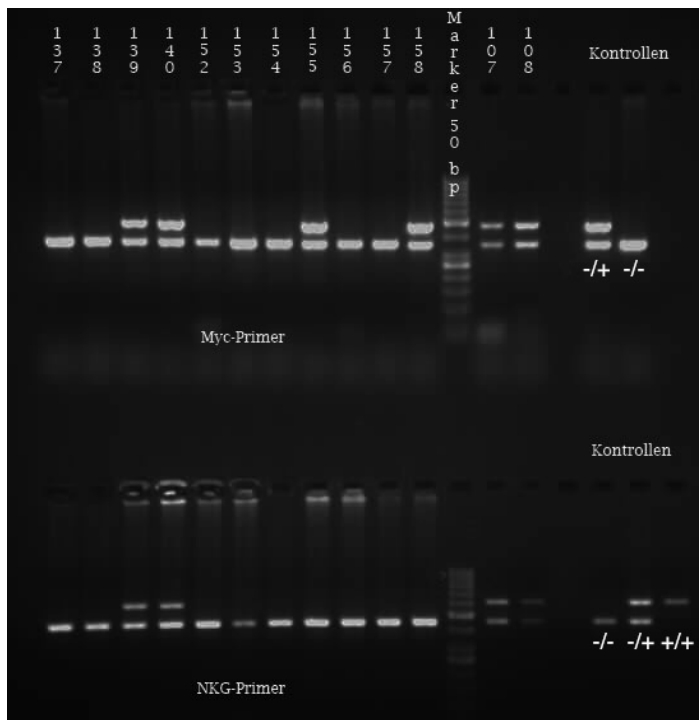


Abbildung 7: Abbildung eines PCR-Agarosegels hinsichtlich Typisierung von *c-myc*- und NKG2D-Rezeptor-Expression; Die Abbildung wurde freundlicherweise bereitgestellt von A. Geishauser (Institut für Molekulare Immunologie, München). Beide Genmerkmale wurden in jeweils getrennten Primer-Ansätzen dargestellt (*Myc*-Primer oder *NKG*-Primer). Bei den Tieren Nr. 155 und 158 handelt es sich um NKG2D-Rezeptor-defiziente *c-myc*-transgene Tiere.

3.2 NK-ZELLEN IM NKG2D-REZEPTOR-DEFIZIENTEN SPONTAN-LYMPHOM-MODELL

NK-Zellen spielen als Teil des angeborenen Immunsystems durch ihre zytotoxische Effektorfunktion in der Abwehr von Infekten und möglicherweise auch von maligne entarteten Zellen eine bedeutende Rolle. Eine funktionelle Einschränkung der NK-Zell-Funktion korreliert sowohl mit einer fortschreitenden Tumorprogression als auch mit einer negativen Krankheitsprognose [72-76].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden NK-Zellen in einem NKG2D-Rezeptor-defizienten autochthonen Lymphommodell auf Veränderungen, die aufgrund reziproker Beeinflussung von Immunsystem und Tumor entstehen, untersucht.

3.2.1 ANZAHL DER NK-ZELLEN IM TUMORGEWEBE

Für das *c-myc*-transgene Spontanlymphom-Modell der Maus konnte bereits gezeigt werden, dass es im Rahmen einer Reaktion des angeborenen Abwehrsystems zu einer Zunahme der NK-Zellzahl in den Lymphknoten kommt [73]. Zur Überprüfung dieser Beobachtung im NKG2D-Rezeptor-defizienten Mausmodell wurde die absolute NK-Zellzahl in den Lymphknoten bestimmt. Dafür wurden die NK-Zellen mit Hilfe von Antikörpern gegen NK1.1 und CD3 identifiziert. Der somit ermittelte prozentuale Anteil wurde jeweils auf die Gesamtzellzahl der entnommenen axillären, mandibulären, inguinalen und zervikalen Lymphknoten normiert.

Aus Abbildung 8 wird ersichtlich, dass sich die NK-Zellen im Vergleich zum Wildtyp im NKG2D-defizienten Spontanlymphom-Modell am Ort der Tumorentstehung anreichern ($p < 0,05$). Ein signifikanter Unterschied der NK-Zellzahl besteht auch zwischen NKG2D-Rezeptor-defizienten Tieren, die sich hinsichtlich ihrer Expression des *c-myc*-Gens unterscheiden. Es zeigt sich hier eine Akkumulation der NK-Zellen in den tumortragenden Mäusen (NKG2D^{-/-} *cmyc*^{+/-}) gegenüber den nicht pathologisch veränderten Spendern (NKG2D^{-/-} *cmyc*^{-/-}) ($p < 0,01$). NK-Zellen werden also an den Ort der Tumorentstehung redirigiert. Der Vergleich zwischen dem NKG2D-Rezeptor-defizienten Tumormodell (NKG2D^{-/-} *cmyc*^{+/-}) und dem NKG2D-Rezeptor-kompetenten Tumormodell (*cmyc*^{+/-}) ergab keinen signifikanten Unterschied in der absoluten NK-Zellzahl.

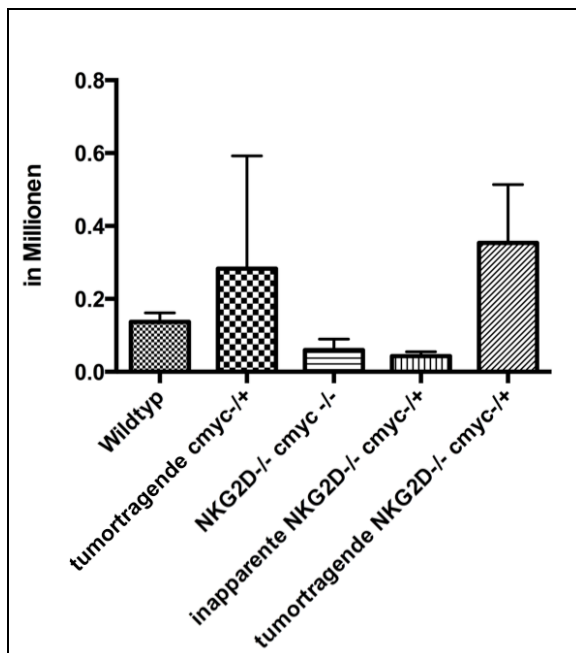


Abbildung 8: Anreicherung der NK1.1⁺CD3⁺-Zellen in Tumorlymphknoten

Die Anzahl der NK-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Es zeigt sich eine Anreicherung von NK-Zellen am Ort der Tumorgenese.

3.2.2 NK-ZELL-MATURIERUNG

Wie viele dem hämatopoetischen System entstammende Zellen durchlaufen auch murine NK-Zellen eine Maturation und können dementsprechend verschiedenen Reifestadien zugeteilt werden. Chiossone *et al.* veröffentlichten eine Kategorisierung, die vier NK-Zell-Stadien anhand der jeweils charakteristischen Expression von CD11b und CD27 unterscheidet [95].

Das erste Reifestadium, R1, wird durch folgendes Expressionsmuster definiert:

$CD11b^{low}CD27^{low}$. In den folgenden Stadien R2 und R3 erfolgt eine Zunahme der Expression von CD27 und CD11b ($R2 = CD11b^{low}CD27^{high}$, $R3 = CD11b^{high}CD27^{high}$). Im höchsten Reifegrad, R4, kommt es schließlich wieder zu einer Abnahme der Expression von CD27 ($R4 = CD11b^{high}CD27^{low}$). Die graduelle Passage der Reifestadien geht mit einem Gewinn an Effektorfunktionen, z. B. der Migrationsfähigkeit, der NK-Zellen einher [95, 96].

Für die Charakterisierung der NK-Zellen aus den Spontanlymphom-Modellen entsprechend diesem Schema wurden die $NK1.1^{+}CD3^{-}$ -Zellen zusätzlich mit spezifischen Antikörpern gegen CD11b und CD27 angefärbt und am Durchflusszytometer vermessen.

Verglichen wurden NK-Zellen aus Wildtypen, *c-myc*-Tumoren und NKG2D-Rezeptor-defizienten Tumoren.

Dabei zeigte sich, wie in Abbildung 9 erkennbar, in den NKG2D-Rezeptor-defizienten autochthonen Lymphomen eine Verschiebung hin zu den reiferen Stadien. Eine prozentuale Zunahme konnte gegenüber den Wildtypen und gegenüber den *c-myc*-transgenen Lymphomen v. a. im R4-Stadium ($CD11b^{high}CD27^{low}$) beobachtet werden.

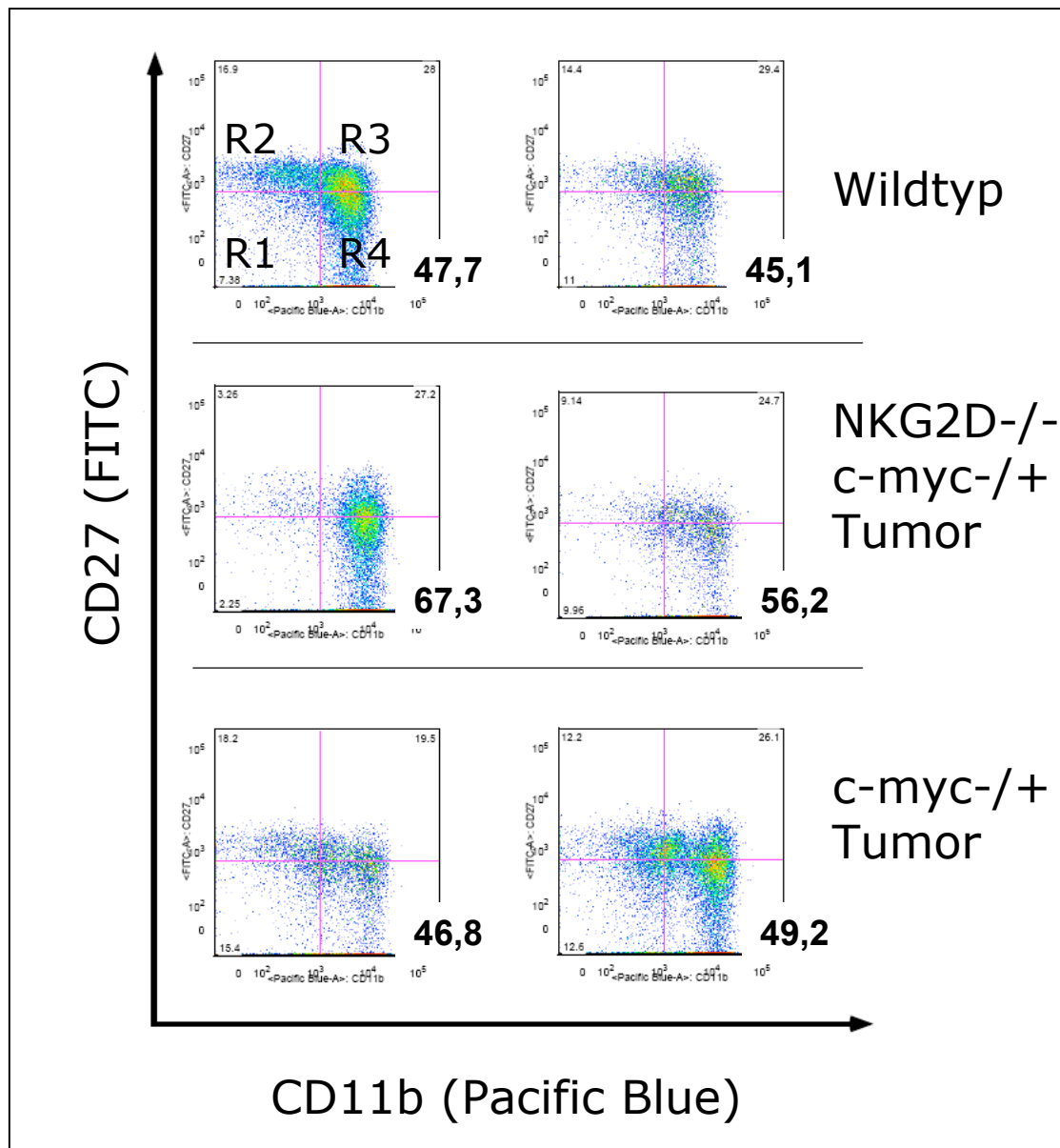


Abbildung 9: Maturierungsstatus der NK-Zellen, exemplarische Darstellung von zwei Experimenten
 Charakterisierung der NK-Zellen verschiedener Spenderorganismen bezüglich der Reifegrade (R1-R4).
 Die Einteilung erfolgte aufgrund der Expression von CD11b (X-Achse) und CD27 (Y-Achse) [95]. NKG2D-
 Rezeptor-defiziente Tumoren zeigen eine Verschiebung der NK-Zell-Population hin zum reifen R4-Stadium.

3.2.3 PHÄNOTYPISIERUNG BEZÜGLICH DER AKTIVIERUNGSMARKER

Brenner *et al.* beobachteten in NK-Zellen des *c-myc*-transgenen autochthonen Lymphommodells eine Diskrepanz zwischen phänotypischer Aktivierung und gleichzeitiger funktioneller Inaktivität [73, 89]. Um die Rolle des NKG2D-Rezeptor-Liganden-Systems im Entstehungsprozess der NK-Zell-Anergisierung zu ermitteln wurden daher im NKG2D-Rezeptor-defizienten Lymphommodell die Aktivierung der NK-Zellen untersucht.

Als Marker des Aktivierungszustandes der NK-Zellen haben sich v. a. CD45R und CD69 bewährt. CD69 ist ein Lektin, dessen Expression bereits früh im Aktivierungsprozess induziert wird [97]. Bei CD45R, welches auch als B220 bezeichnet wird, handelt es sich um einen ubiquitären B-Zell-Marker, der auch auf aktiven NK-Zellen vorhanden ist [98].

Es wurden NK1.1⁺CD3⁻-Zellen verschiedener Spendertiere auf das Vorhandensein beider Marker untersucht. Die Analyse erfolgte am Durchflusszytometer.

Für die aus *c-myc*-transgenen Tumoren isolierten NK-Zellen wurde bereits ein aktivierter Phänotyp bei gleichzeitiger funktioneller Anergisierung der NK-Zellen beschrieben [73].

Wie in Abbildung 10 dargestellt, zeigt sich auch für die NKG2D-Rezeptor-defizienten NK-Zellen eine Hochregulation der Aktivierungsmarker CD69 (Abb. 10 A) und CD45R (Abb. 10 B). Somit weisen auch die aus NKG2D-Rezeptor-defizienten Lymphomen isolierten NK-Zellen einen aktivierten Phänotyp auf.

Zwischen den NKG2D-Rezeptor-defizienten und den NKG2D-Rezeptor-kompetenten Tumormodellen konnte in der Expression von CD69 und CD45R kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

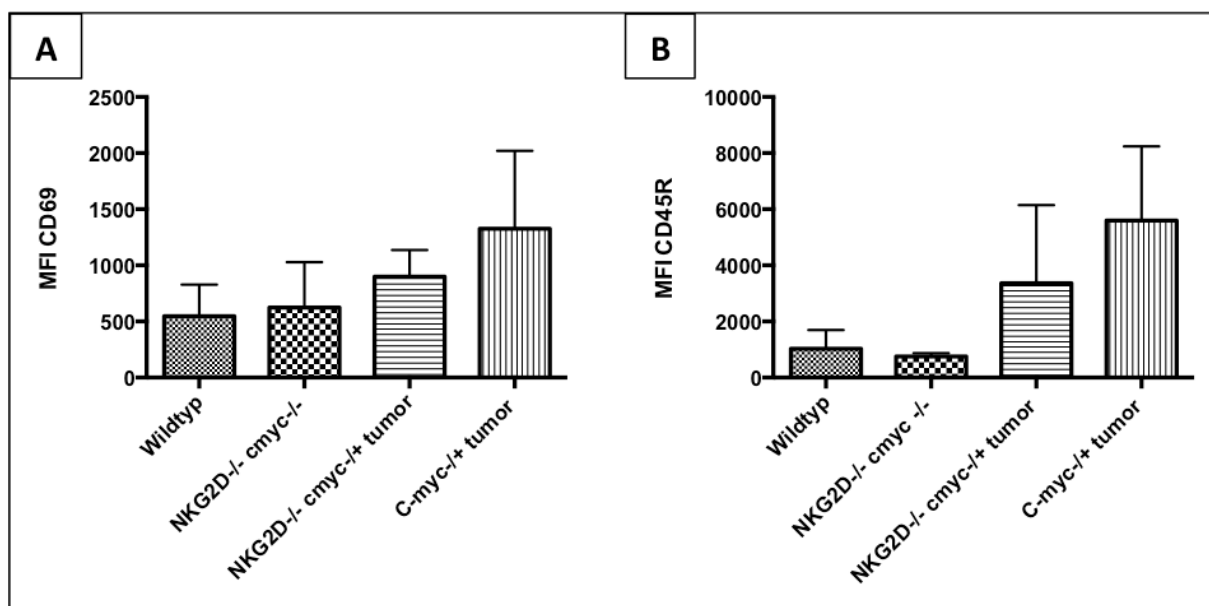


Abbildung 10: Durchflusszytometrische Bestimmung der NK-Zell-Aktivierungsmarker CD69 (A) und CD45R (B); Dargestellt wird die gemessene mittlere Fluoreszenzintensität (MFI; Y-Achse) für die jeweiligen Spender (X-Achse). Die Tumorentitäten zeigen im Vergleich zum Wildtyp einen aktivierten Phänotyp.

3.2.4 IN-VIVO-PRODUKTION VON IFN- γ

Die Produktion des proinflammatorischen Zytokins IFN- γ gilt als eine wichtige Effektorfunktion der NK-Zellen im Rahmen einer Antwort der angeborenen Immunität [73].

Es wurde gezeigt, dass eine Stimulierung des NKG2D-Rezeptors durch die Liganden Rae1 und H60 eine Sekretion von IFN- γ zur Folge haben kann [73].

Der für NK-Zellen des *c-myc*-transgenen Spontanlymphoms beschriebene Zustand der aktivierungsinduzierten Erschöpfung zeigte eine signifikante Abnahme der IFN- γ -Produktion in tumortragenden Mäusen [73] (Abbildung 12). In Zusammenschau dieser Ergebnisse mit der passageren Hochregulation der NKG2D-Liganden auf den Tumorzellen und der beobachteten sekundär aktivierenden Funktion des NKG2D-Rezeptors wurde eine kausale Beteiligung des NKG2D-Rezeptors an der Entstehung der Funktionsstörung der NK-Zellen vermutet. Folglich stellte sich die Frage, ob die aus Tumoren isolierten, phänotypisch aktivierten NKG2D-Rezeptor-defizienten NK-Zellen im Gegensatz zu den *c-myc*-transgenen NK-Zellen weiterhin eine Produktion von IFN- γ aufweisen. Dies würde die Beteiligung des NKG2D-Rezeptors an der Entstehung der „aktivierungsinduzierten Erschöpfung“ bestätigen.

Zur Untersuchung der NKG2D-Rezeptor-defizienten NK-Zellen wurden intrazelluläre IFN- γ -Färbungen vorgenommen, die anschließend am Durchflusszytometer vermessen wurden.

Abbildung 11 zeigt die prozentualen Anteile der IFN- γ -positiven Zellen (A) und die relative IFN- γ -Expression (B). Die relative Expression ist dabei normiert auf den im jeweiligen Experiment mitbestimmten Wildtyp-Wert.

In beiden Diagrammen lässt sich eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte IFN- γ -Produktion der *nicht c-myc*-transgenen NKG2D-Rezeptor-defizienten Spender feststellen ($p < 0,05$ in A).

Diesbezüglich liegen Hinweise vor, die auf eine Dysregulation im Sinne einer Erhöhung der IFN- γ -Produktion bei NKG2D-Rezeptor-Defizienz schließen lassen. Die Dysregulation wurde jedoch nicht weiter untersucht.

Bei Ausbildung eines Spontanlymphoms erfolgt auch bei NKG2D-Rezeptor-Defizienz eine Suppression der IFN- γ -Produktion. Diese erwies sich im Vergleich von *nicht c-myc*-transgenen NKG2D-Rezeptor-defizienten Tieren mit erkrankten *c-myc*-transgenen NKG2D-Rezeptor-defizienten Spendern als hochsignifikant ($p < 0,01$ in A und B), fiel jedoch nicht unter die Vergleichswerte des Wildtyps. Schon bei klinisch inapparenten *c-myc*-transgenen Tieren lässt sich eine Beeinträchtigung der Zellen bezüglich des untersuchten Zytokins erkennen.

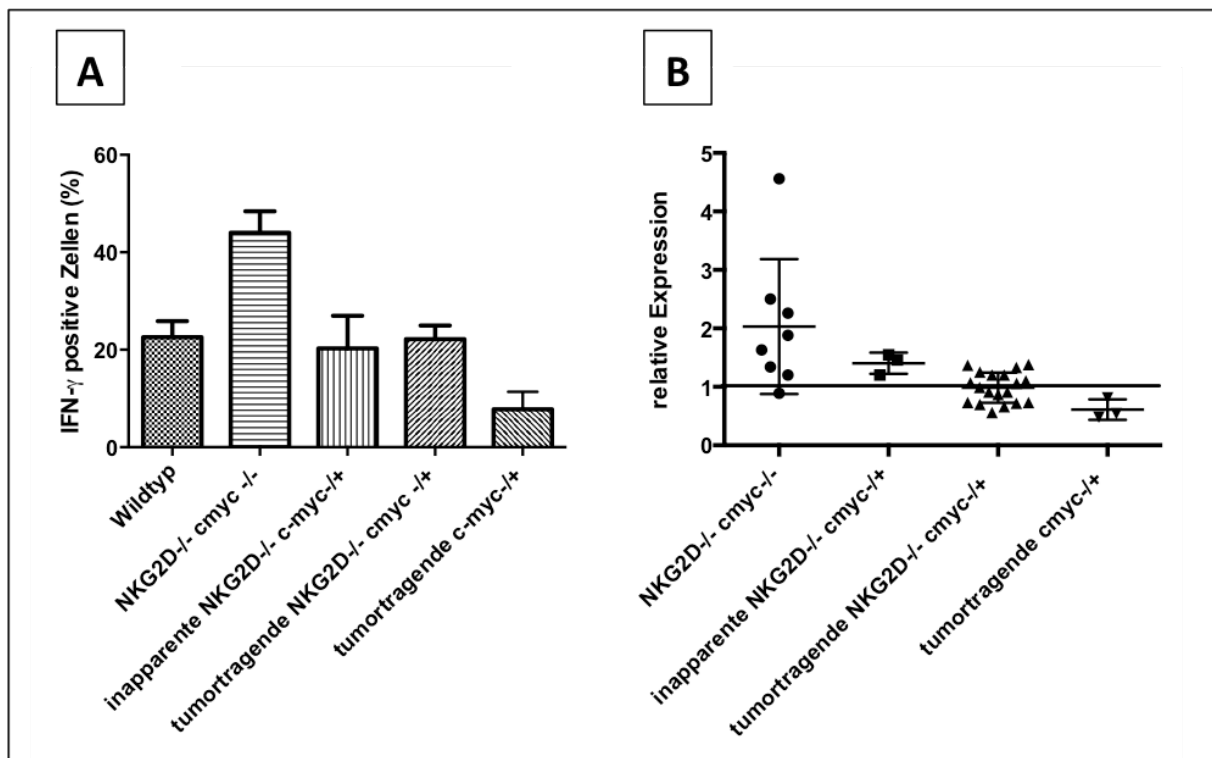


Abbildung 11: Durchflusszytometrische Analyse der IFN- γ -Produktion

Die NK1.1⁺CD3⁻-Zellen wurden intrazellulär mit einem gegen IFN- γ gerichteten Antikörper gefärbt und anschließend vermessen. Diagramm A zeigt den Prozentanteil der IFN- γ -positiven NK-Zellen der jeweiligen Spender. In Diagramm B wird die relative IFN- γ -Expression der NK-Zellen dargestellt. Dabei wurden die Werte auf den im jeweiligen Experiment mitbestimmten Wildtyp normiert (als Linie gekennzeichnet). Die NKG2D-Rezeptor-defizienten Spender (NKG2D-/- cmyc-/-) zeigen einen erhöhten Ausgangswert an IFN- γ . Dieser wird bei Tumorgenese (inapparente- und tumortragende NKG2D-/- cmyc-/+) supprimiert.

3.2.5 IN-VITRO-ZYTOTOXIZITÄT BEI NKG2D-REZEPTOR-DEFIZIENZ

Neben der Zytokinsekretion ist die Auslösung der Apoptose in körperfremden oder mutierten Zielzellen eine wichtige Effektorfunktion der NK-Zellen im Rahmen der angeborenen Abwehr [99, 100]. Brenner *et al.* beschrieben im *c-myc*-transgenen Spontanlymphom für den NKG2D-Rezeptor eine sekundär aktivierende Funktion, die zur Auslösung der Zytotoxizität führen kann [99, 100].

Um die Zytotoxizität der NKG2D-Rezeptor-defizienten NK-Zellen zu überprüfen, wurde ein Chrom-Freisetungs-Versuch durchgeführt. Als Zielzellen dienten dafür mit radioaktivem Chrom markierte murine YAC-1-Lymphomzellen, die von NK-Zellen erkannt werden. Die als Effektoren dienenden NK-Zellen wurden zunächst immunmagnetisch angereichert und dann in verschiedenen Verhältnissen vier Stunden mit den Zielzellen inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Radioaktivität, die aus den untergegangenen Ziel-

zellen freigesetzt wurde, ermittelt. Dadurch kann der Anteil der lysierten YAC-1-Zellen ermittelt werden.

In den Experimenten wurde stets ein Vergleich zwischen Wildtyp und *nicht c-myc*-transgenen NKG2D-Rezeptor-defizienten Mäusen angestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die *nicht c-myc*-transgenen NKG2D-Rezeptor-defizienten NK-Zellen keine relevante zytotoxische Aktivität zeigen. Im Gegensatz dazu zeigen die Wildtyp-NK-Zellen eine Elimination der murinen Tumorzellen.

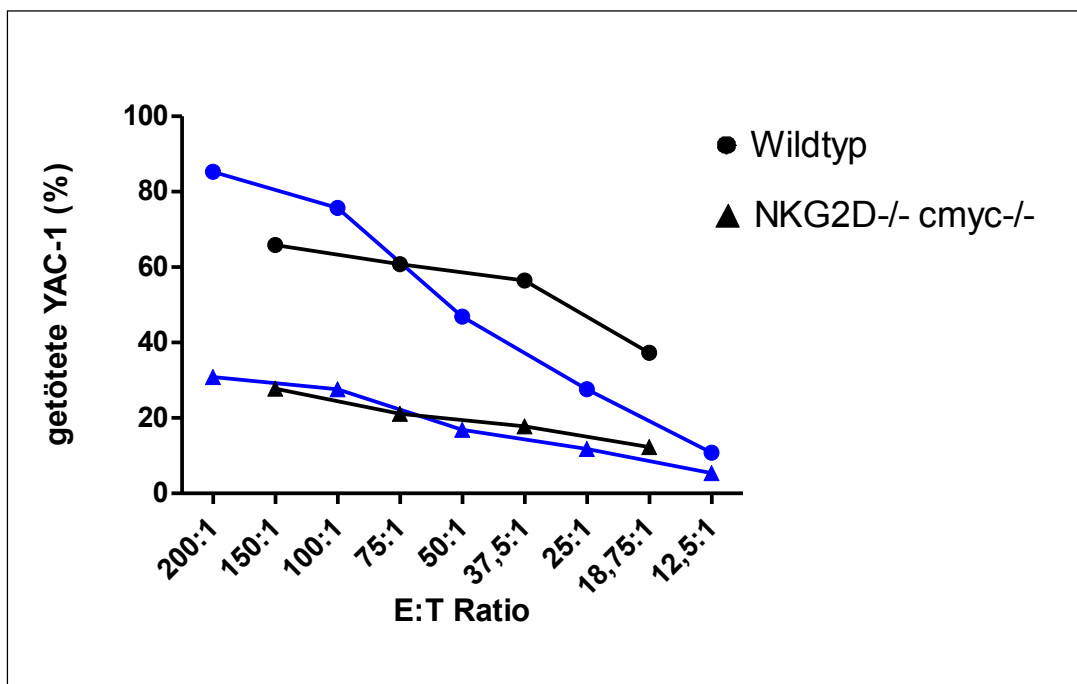


Abbildung 12: Durch ^{51}Cr -Freisetzung ermittelte Zytotoxizität der NKG2D-Rezeptor-defizienten NK-Zellen; Die immunmagnetisch hoch angereicherten $\text{NK1.1}^+\text{CD3}^-$ -Zellen wurden mit radioaktiv markierten YAC-1-Zellen in verschiedenen Effektor-Zielzell-Verhältnissen (E:T Ratio, X-Achse) inkubiert. Anschließend wurde die durch Zytolyse freigesetzte Radioaktivität gemessen und der Prozentanteil der getöteten YAC-1-Zellen (Y-Achse) ermittelt. Es werden beispielhaft zwei Experimente dargestellt (Experiment 1 in blau, Experiment 2 in schwarz). Als Spendertiere dienten jeweils Wildtypen und *nicht c-myc*-transgene NKG2D-Rezeptor-defiziente Mäuse. In beiden Fällen ist eine extrem eingeschränkte Zytotoxizität der NKG2D-Rezeptor-defizienten NK-Zellen festzustellen.

3.2.6 IN-VIVO-UNTERSUCHUNG VON CD107a

Bei einer Degranulation der lysosomalen Vesikel aktivierter NK-Zellen wird das *Lysosomen-assoziierte Membranprotein-1 (LAMP1)*, das auch als CD107a bezeichnet wird, in die Zellmembran der NK-Zellen integriert [101]. Daher korreliert die auf der NK-Zelloberfläche de-

tektierte Menge an CD107a mit der zytotoxischen Aktivität [102, 103].

In bisher unpublizierten Daten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass im *c-myc*-transgenen Spontanlymphom-Modell NK-Zellen CD107a auf ihrer Zelloberfläche tragen (siehe Abbildung 13).

Nachdem die NK-Zellen der NKG2D-Rezeptor-defizienten Mäuse keine Zytotoxizität aufwiesen, aber in Tumoren einen aktivierten Phänotyp zeigten, war nun auch das Degranulationsverhalten der Zellen von Interesse.

Zur Detektion der CD107a-Spiegel auf der Zelloberfläche der NKG2D-Rezeptor-defizienten NK-Zellen wurden dazu NK1.1⁺CD3⁻-Zellen isoliert und mit einem Antikörper, der gegen CD107a gerichtet ist, am Durchflusszytometer vermessen.

In Abbildung 13 ist der CD107a-positive Prozentanteil der NK-Zellen der Lymphknoten dargestellt. Der Unterschied am Ort der primären Tumorgenese erwies sich als nicht signifikant. Ebenso war der Unterschied zwischen klinisch inapparenten Mäusen zu Wildtyp und zu erkrankten Spendertieren nicht signifikant (Daten nicht abgebildet).

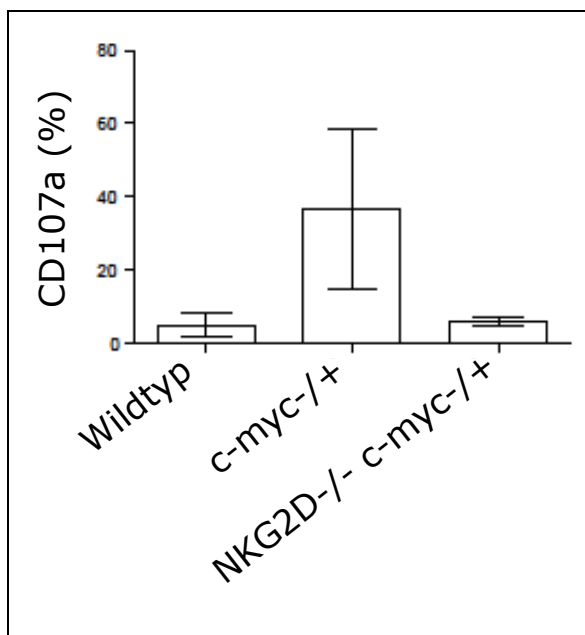


Abbildung 13: Prozentanteil der CD107a-positiven NK1.1⁺CD3⁻-Zellen in Lymphknoten, Abbildung nach Belting et al. [104] Es zeigt sich im Vergleich zum Wildtypen kein signifikanter Unterschied in der Expression des Degranulationsmarkers auf der Zelloberfläche der aus NKG2D-Rezeptor-defizienten Tumoren isolierten NK-Zellen. Im Gegensatz dazu zeigt sich eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte Menge von CD107a auf der Oberfläche der NK-Zellen des *c-myc*-transgenen Lymphommodells (Daten der *c-myc*-transgenen Spendertiere freundlichweise bereitgestellt von M. Przewoznik). Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

3.3 EINFLUSS DES TUMORMILIEUS

3.3.1 ZYTOKINMILIEU IM NKG2D-REZEPTOR-DEFIZIENTEN LYMPHOM

Für die Immunevasion maligner Zellen wird eine große Bedeutung des im Tumor vorherrschenden Mikromilieus angenommen [63, 105]. Zum Beispiel ist eine Vielzahl der in Immunprozessen involvierten Zellen in der Lage, Zytokine zu produzieren, die über diverse Signalkaskaden Zielzellen modulieren können [106]. Dabei kann in disseminierten Tumoren häufig eine Verschiebung zu einem Th2-Zytokinmuster festgestellt werden, welches ursprünglich bei chronisch-allergischen Erkrankungen beschrieben wurde und eine verminderte zelluläre Immunität bedingt [107, 108].

Auch im NKG2D-Rezeptor-defizienten Spontanlymphom-Modell wurde in Überständen von Lymphknoten-Zellen ein Überwiegen der Th2-typischen Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 gefunden (siehe Abbildung 14).

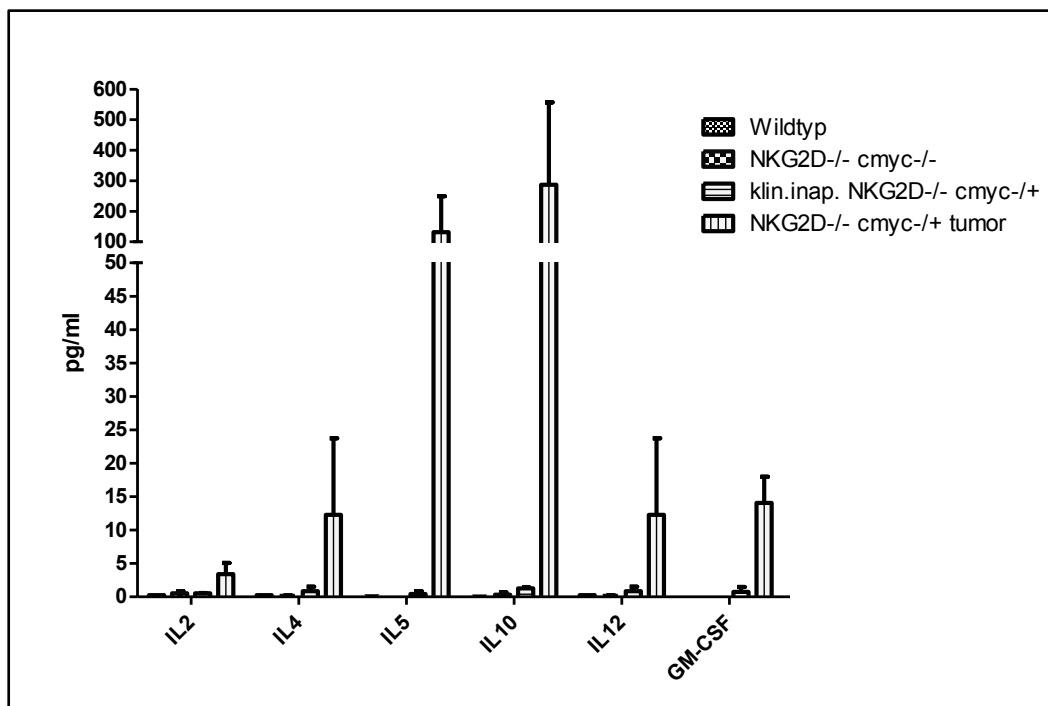


Abbildung 14: Analyse des Zytokinmilieus in Zellüberständen mittels Bioplex-Verfahren

Die NKG2D-Rezeptor-defizienten Tumoren zeigen gegenüber den gesunden Spendern eine Dysregulation der Zytokinproduktion. Es überwiegen Th2-assoziierte Zytokine.

3.3.2 IN-VITRO-EINFLUSS DES TUMORMILIEUS

Neben Zytokinen können auch z.B. lösliche NKG2D-Liganden oder metabolische Veränderungen wie Azidose oder Hypoglykämie zu einer Funktionseinschränkung von Immunzellen führen [49, 79]. Zur Untersuchung dieses Einflusses *in vitro* wurden immunmagnetisch angereicherte NK-Zellen mit murinen Tumorzellen der Linie 291 kokultiviert. Während der Koinkubation, die 18 Stunden in Nährmedium ablief, wurde ein Tumormilieu generiert, das sich auf die NK-Zellen auswirkte. Als Funktionsparameter wurde anschließend die IFN- γ -Produktion der NK-Zellen bestimmt. Dies geschah mittels intrazellulärer Antikörper-basierter Färbung und anschließender Vermessung am Durchflusszytometer. Zur Kontrolle erfolgte jeweils eine Inkubation der NK-Zellen in reinem Nährmedium. Als Spender dienten hierfür Wildtypen und *nicht c-myc*-transgene NKG2D-Rezeptor-defiziente Tiere.

Wie in Abbildung 15 ersichtlich ist, wird im Tumormilieu die IFN- γ -Produktion der NK-Zellen beider Spender supprimiert. Im Vergleich lässt sich, unter Berücksichtigung des höheren IFN- γ -Ausgangswertes der NKG2D-Rezeptor-defizienten Zellen, keine relative Differenz feststellen.

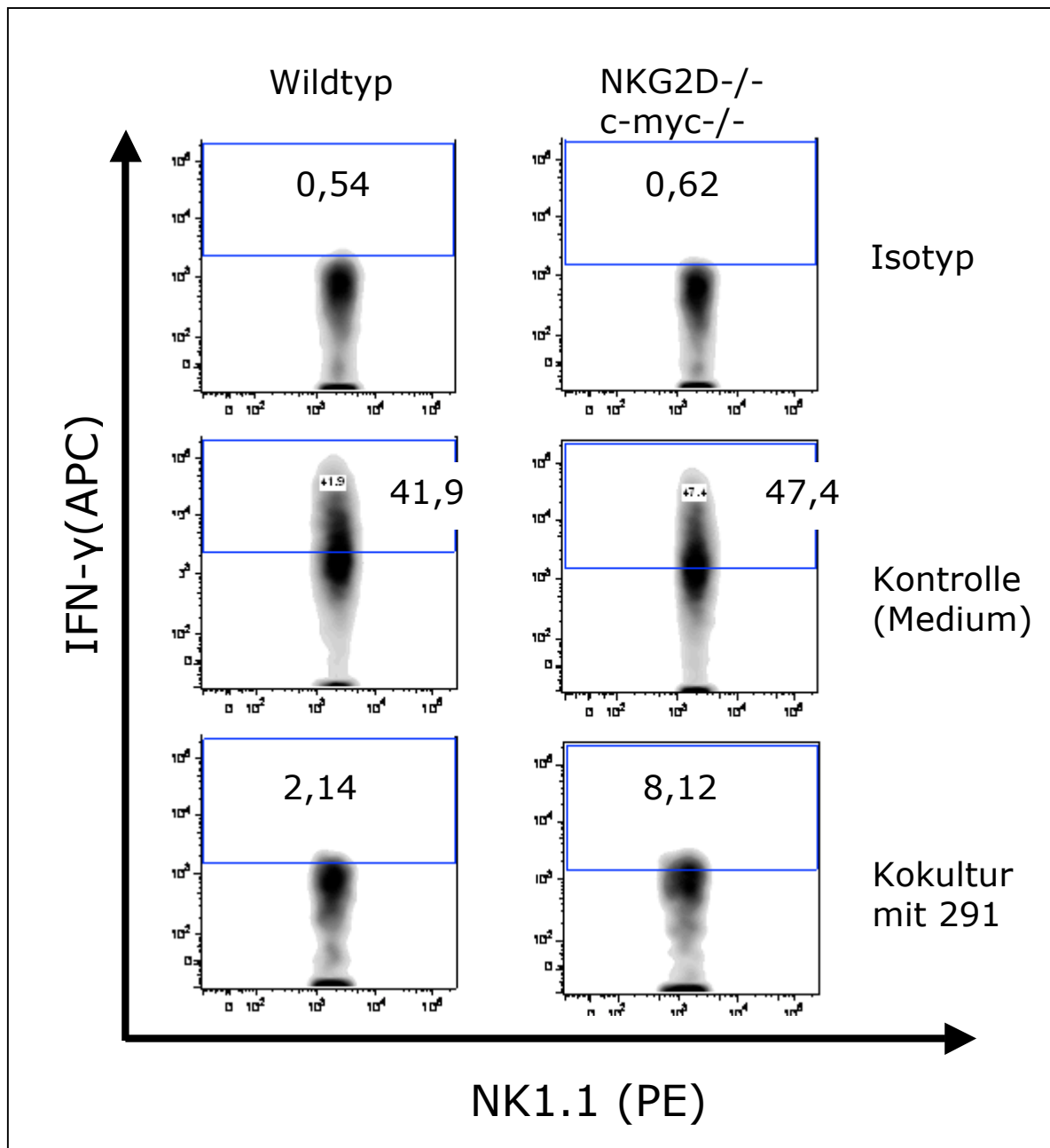


Abbildung 15: Kokultur von NK1.1⁺CD3⁻-Zellen mit murinen 291-Tumorzellen

Einfluss des Tumormilieus auf die Funktion der NKG2D-Rezeptor-defizienten NK-Zellen. Es wurden immunmagnetisch angereicherte Zellen für 18 Stunden entweder mit Medium (Kontrolle) oder mit Tumorzellen der Linie 291 koinkubiert. Danach wurde der IFN-γ-Anteil durchflusszytometrisch beurteilt. Dazu wurde eine Isotyp-Kontrolle zum Ausschluss unspezifischer Antikörperbindung durchgeführt. In beiden Ansätzen liegt eine Suppression der IFN- γ-Produktion vor.

3.4 WEITERE FOLGEN DER NKG2D-REZEPTOR-DEFIZIENZ

3.4.1 EXPRESSIONSNIVEAU DER NKG2D-REZEPTOR-LIGANDEN

Die physiologischen Liganden des aktivierenden NKG2D-Rezeptors werden hauptsächlich bei Zellstress induziert [59]. Die veränderten, NKG2D-Ligand-exprimierenden Zellen werden dadurch von NK-Zellen erkannt und beseitigt [57, 109]. Jedoch wurde ein Verlust der NKG2D-Liganden auf der Oberfläche von Tumorzellen auch als Mechanismus der Tumorevasion beschrieben [49, 79, 110].

Das *c-myc*-transgene Lymphommodell wies in niedrigen Tumorstadien eine bis zu zehnfach erhöhte Expression von NKG2D-Liganden auf. Bei Tumorprogression kam es zum Verlust der Ligandenexpression im Sinne einer Tumorevasion [73, 89]. Des Weiteren wurde *in vitro* gezeigt, dass auf einen Kontakt der NK-Zellen mit zellulären NKG2D-Liganden eine Abnahme des NKG2D-Rezeptors auf der Zelloberfläche folgte [89].

Es stellte sich also die Frage, ob das Fehlen des Oberflächenrezeptors NKG2D eine Auswirkung auf die Expression der Liganden v.a. in hohen Tumorstadien zur Folge hätte.

Zur Beurteilung des Expressionsstatus der Liganden im NKG2D-Rezeptor-defizienten Spon-
tanlymphom-Modell wurden durchflusszytometrische Messungen ausgeführt.

Dabei wurden die membranständigen NKG2D-Liganden mit Hilfe eines Tetramers angefärbt. Anschließend wurden die CD19-positiven B-Zellen der Lymphome auf die Fluoreszenzintensität hinsichtlich des an das Tetramer gekoppelten Farbstoffes PE überprüft. Abbildung 16 zeigt, dass am Ort der primären Tumorgenese, den Lymphknoten, eine Veränderung des Expressionsmusters erfolgt. Bei Fehlen des Rezeptors wird eine vermehrte Expression von NKG2D-Ligand auf der Zelloberfläche der B-Zellen klinisch erkrankter Mäuse detektiert.

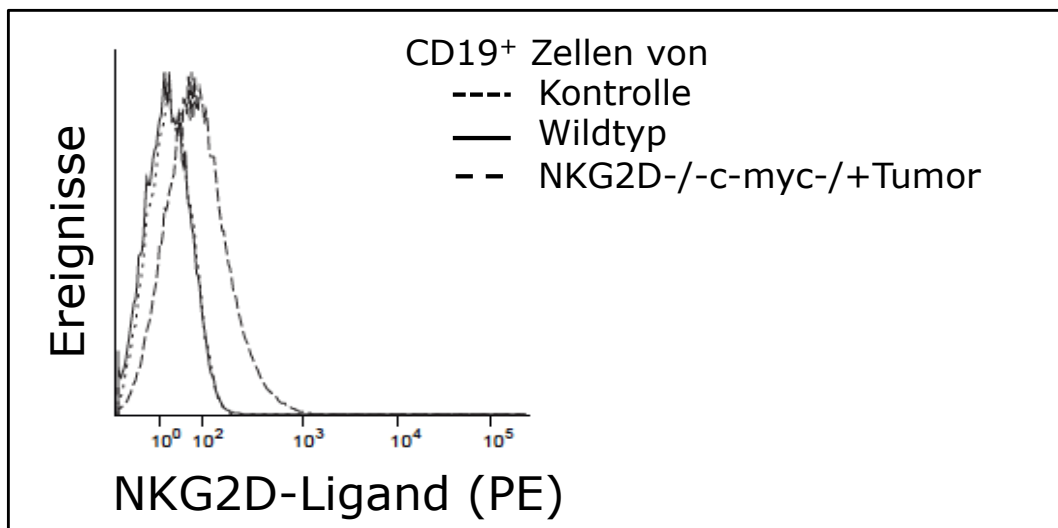


Abbildung 16: FACS-Diagramm zur Beurteilung der Expression von NKG2D-Liganden auf Zelloberflächen, Abbildung nach Belting *et al.* [104] Dabei dienten Tumorzellen der Linie RMA-S als Negativkontrolle. Es wird die Expression der NKG2D-Liganden zwischen B-Zellen aus Wildtyp-Lymphknoten und NKG2D-/-c-myc-/ +Tumoren verglichen. Es lässt sich im Lymphknoten eine Anreicherung der Liganden erkennen.

3.4.2 EXPRESSION VON CD3ZETA

CD3 ζ ist ein Adaptor-Protein, das auf T- und NK-Zellen exprimiert wird und u.a. die Funktionen des T-Zell-Rezeptors und der Fc γ III-, NKp30- und NKp46-Rezeptoren vermittelt [111, 112]. Im humanen System wurde eine reduzierte oder fehlende Aktivität von CD3 ζ im Zusammenhang mit Tumorleiden, Autoimmunkrankheiten und Infektionen beschrieben [113]. Hanaoka *et al.* konnten zeigen, dass eine beeinträchtigte Funktion des NKG2D-Rezeptors mit einer Aktivitätszunahme der Caspasen 3 und 7 einhergeht, die wiederum zu einer Degradation von CD3 ζ führt [114]. Somit wurde eine Verbindung zwischen einem modulierten NKG2D-System und den bei CD3 ζ -Defekten auftretenden funktionellen Zelldefiziten hergestellt. Es stellte sich folglich die Frage, ob es bei fehlendem NKG2D-Rezeptor zu Veränderungen der CD3 ζ -Expression kommen würde. Falls Änderungen vorlägen, könnte dies Hinweis auf eine modulierte T-Zell-Funktion sein.

Im NKG2D-Rezeptor-defizienten Spontanlymphom-Modell wurden die CD3 ζ -Kette auf NK-Zellen, CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Für alle drei Immunzellpopulationen zeigt Abbildung 17 einen Vergleich zwischen aus Wildtypen und aus erkrankten Spendern isolierten Zellen. Es besteht bei allen NKG2D-Rezeptor-defizienten Zellpopulationen gegenüber dem Wildtypen ein signifikant reduzierter CD3 ζ -Spiegel ($p < 0,05$ in allen Vergleichspaaren).

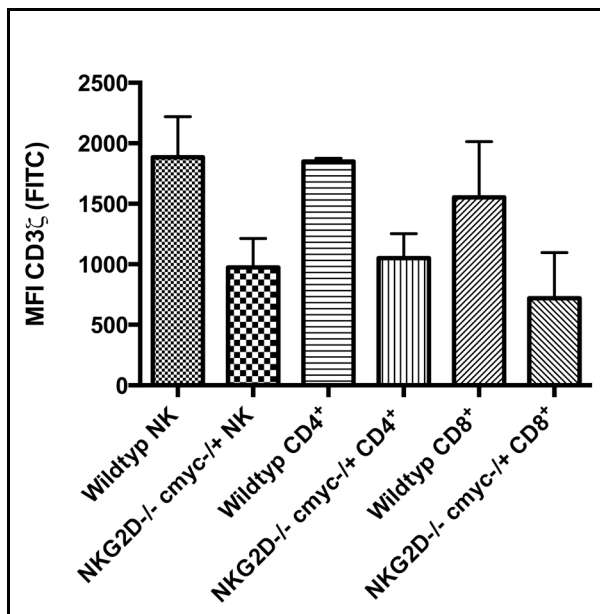


Abbildung 17: Reduzierte CD3 ζ -Spiegel auf NKG2D-Rezeptor-defizienten NK-, CD4⁺ und CD8⁺-Zellen
 Der Vergleich zwischen Zellen, die aus Wildtypen und aus *c-myc*-transgenen NKG2D-Rezeptor-defizienten Tumoren isoliert wurden, zeigt gegenüber dem Wildtypen eine verminderte Expression von CD3 ζ auf NK-, CD4⁺, und CD8⁺-Zellen. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch.

3.5 TUMORGENESE BEI NKG2D-REZEPTOR-DEFIZIENZ

Im Rahmen der angeborenen Immunität sind NK-Zellen in die schnelle Elimination von maligne entarteten Zellen involviert und verbinden z.B. durch Sekretion von Zytokinen die angeborene mit der erworbenen Immunität [35]. Eine gestörte NK-Zell-Funktion konnte in der Vergangenheit mit einer erhöhten Tumorzinzidenz und mit einer schlechteren Prognose assoziiert werden [72-76].

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf tiefgreifende Störungen der NKG2D-Rezeptor-defizienten NK-Zellen hin. Besonders hervorzuheben ist hierbei die fehlende Zytotoxizität gesunder *nicht c-myc*-transgener Tiere. Zudem ist bei aktiviertem Phänotyp der aus Tumoren isolierten NK-Zellen die IFN- γ -Produktion supprimiert. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass auch andere Immunzellpopulationen funktionell verändert sein könnten. Somit stellte sich die Frage einer Auswirkung dieser Aberrationen auf das Gesamtüberleben des NKG2D-Rezeptor-defizienten *c-myc*-transgenen Modellorganismus.

Um eine Aussage bezüglich der Mortalität zu treffen, wurden die Todeszeitpunkte von spontan erkrankten NKG2D-Rezeptor-defizienten mit NKG2D-Rezeptor-kompetenten Mäusen verglichen.

Das Kaplan-Meier-Diagramm der Abbildung 18 zeigt das signifikant frühere Versterben der

NKG2D-Rezeptor-defizienten Tiere (Log-rank Test $p < 0,01$). Dabei lag die mittlere Überlebenszeit der *c-myc*-transgenen Tiere bei 192 Tagen, die der NKG2D-Rezeptor-defizienten *c-myc*-transgenen Tiere bei 135 Tagen. Es lässt sich somit eine durchschnittliche Reduktion der Überlebenszeit bei NKG2D-Rezeptor-Defizienz um ca. 8 Wochen feststellen.

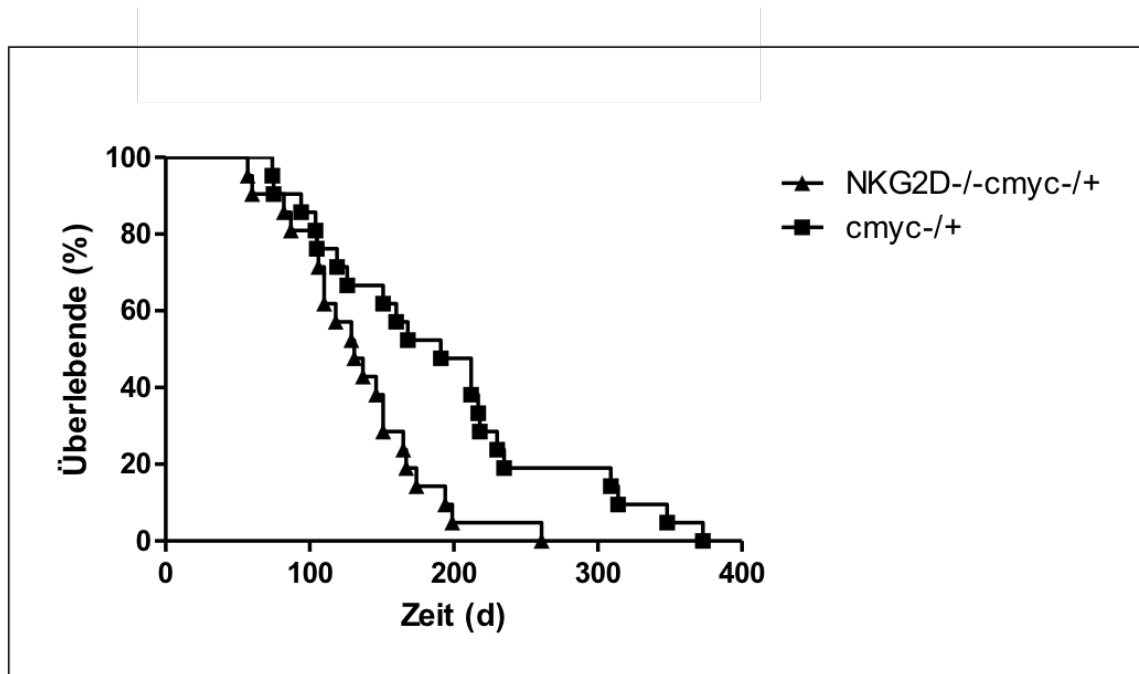


Abbildung 18: Kaplan-Meier-Diagramm der Überlebenszeiten

Verglichen wurden die Todeszeitpunkte von NKG2D-Rezeptor-defizienten Tieren (NKG2D-/- *cmyc*-/+) und NKG2D-Rezeptor-kompetenten Tieren (*cmyc*-/+). Beide Gruppen erkrankten spontan an Lymphomen. (Log-rank Test $p < 0,01$)

4 Diskussion

4.1 NK-ZELLEN IM NKG2D-REZEPTOR-DEFIZIENTEN

SPONTANLYMPHOM-MODELL

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Charakteristika und die Funktion der NK-Zellen in einem NKG2D-Rezeptor-defizienten *c-myc*-transgenen Spontanlymphom-Modell untersucht. Vom Beginn der Tumorgenese bis zum Endstadium einer malignen Erkrankung kommt es zu ständigen Interaktionen genetisch veränderter Tumorzellen mit infiltrierenden Zellen des Immunsystems. Dabei hat sich eine Anreicherung von NK-Zellen und anderen Lymphozyten als prognostischer Vorteil für Tumorpatienten erwiesen [74, 76, 115]. Eine Zunahme der absoluten NK-Zellzahl am Ort der primären Tumorgenese, den Lymphknoten, konnte auch im NKG2D-Rezeptor-defizienten Spontanlymphom-Modell gezeigt werden (Abbildung 8). Zudem zeigten die aus Tumoren isolierten NK-Zellen des NKG2D-Rezeptor-defizienten Spontanlymphom-Modells eine Hochregulation der Aktivierungsmarker CD69 und CD45R auf der Zelloberfläche (Abbildung 10) [97, 98, 116]. Ferner konnte *in vivo* eine Verschiebung der NK-Zell-Verteilung zugunsten des R4-Stadiums nach Chiossone *et al.* festgestellt werden (Abbildung 9) [95]. Somit befinden sich im NKG2D-Rezeptor-defizienten Spontanlymphom-Modell redirigierte reife und phänotypisch aktivierte NK-Zellen.

Die Funktion der NKG2D-Rezeptor-defizienten NK-Zellen erwies sich jedoch als stark eingeschränkt. So erfolgte während der Tumorprogression ebenso wie bei NKG2D-Rezeptor kompetenten *c-myc*-transgenen NK-Zellen eine Suppression der *In-vivo*-Produktion des Effektorzytokins IFN- γ (Abbildung 11). Diese Reduktion der IFN- γ -Produktion ließ sich auch *ex vivo* in NK-Zellen gesunder NKG2D-Rezeptor-defizienter Spender durch Kokultur mit Tumorzellen hervorrufen (Abbildung 15). IFN- γ , welches hauptsächlich von NK-Zellen produziert wird, gilt als wichtiges Effektorzytokin, da es eine Th1-Antwort einleiten und dadurch eine gegenüber Tumoren protektive Immunantwort auslösen kann [13, 117-121].

Entscheidend ist die Beobachtung, dass bereits NK-Zellen gesunder NKG2D-Rezeptor-defizienter Spender *in vitro* keine zytotoxische Aktivität gegenüber YAC-1-Zellen zeigen (Abbildung 12). Auch die Beurteilung des Degranulationsmarkers CD107a *in vivo* bestätigt das Defizit der NKG2D-Rezeptor-defizienten NK-Zellen hinsichtlich der Zytolyse. Es konnte in tumorösen Lymphknoten, dem Ort des primären Kontakts zwischen Immunsystem und Tumor, keine vermehrte Vesikelexozytose registriert werden (Abbildung 13).

Des Weiteren kommt es in den NKG2D-Rezeptor-defizienten Tumoren zu einer Dysregulati-

on des Zytokin-Haushaltes. Diese Veränderungen haben v. a. Funktionsstörungen der adaptiven Abwehr zur Folge [89, 122, 123]. V.a. der IFN- γ Haushalt erwies sich als gestört (Abbildung 14, Abbildung 11). Es zeigte sich bei gesunden NKG2D-Rezeptor-defizienten Spendern eine signifikante Erhöhung der Anzahl der IFN- γ -produzierenden NK-Zellen und eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte relative Expression des Zytokins (Abbildung 11). Die IFN- γ -Konzentration fiel selbst bei Suppression im Tumormilieu weder *in vivo* noch *ex vivo* unter die des Wildtypen (Abbildung 11 und 15). Auch Zafirova *et al.* fanden in stimulierten NKG2D-Rezeptor-defekten Zellen eine höhere Anzahl von IFN- γ -produzierenden NK-Zellen, konnten jedoch keine quantitative Zunahme des Zytokins feststellen [94].

Ein weiterer Aspekt, der eine funktionelle Störung weiterer Immunzellpopulationen mutmaßen lässt, ist die reduzierte Expression von CD3 ζ , einem auf NK- und T-Zellen vorkommendem Signal-Adaptor-Protein, das mit diversen pathologischen Zuständen assoziiert ist und z.B. in dysfunktionellen NK-Zellen in Ovarial-Karzinomen festgestellt werden konnte [124, 125]. In Lymphomen der NKG2D-Rezeptor-defizienten Mäuse konnte eine signifikante Reduktion von CD3 ζ auf CD4 $^{+}$ -, CD8 $^{+}$ -T-Zellen und NK-Zellen gezeigt werden (Abbildung 17). Diese Beobachtung stellt jedoch nur einen Hinweis auf eine mögliche Affektion anderer Zellpopulationen dar und müsste weiter untersucht werden.

Die Gesamtheit der durch NKG2D-Rezeptor-Defizienz hervorgerufenen Störungen des Immunsystems zeigen sich in einer reduzierten Lebenserwartung der NKG2D-Rezeptor-defizienten *c-myc*-transgenen Mäuse im Vergleich zum NKG2D-Rezeptor-kompetenten Spontanlymphom. Bei Fehlen des NKG2D-Oberflächenrezeptors kommt es zum signifikant früheren Versterben der Mäuse an einem autochthonen Lymphom (Abbildung 18).

4.2 AKTIVIERUNGSINDUZIERT ERSCHÖPFUNG DER NK-ZELLEN

Im *c-myc*-transgenen Spontanlymphom-Modell konnte, bei aktiviertem NK-Zell-Phänotyp und vermehrter Degranulation sekretorischer Vesikel, eine starke Suppression der Effektorfunktionen gezeigt werden [73, 92].

Da es sich beim NKG2D-Rezeptor um einen sekundär aktivierenden Rezeptor handelt, dessen Funktion in vielen Tumoren im Sinne einer Immunevasion moduliert wird, erschien eine ursächliche Beteiligung des Rezeptors an der Entstehung der „aktivierungsinduzierten Erschöpfung“ der IFN- γ -Produktion denkbar. Die Überlegung konnte einerseits durch Beobachtungen von Zafirova *et al.*, die eine vermehrte Resistenz NKG2D-Rezeptor-defizienter Mäusen gegenüber einer Infektion mit dem *MCMV* feststellten, unterstützt werden [94]. Andererseits

trugen die von Brenner *et al.* beschriebenen Dysregulationen im NKG2D-Rezeptor-Liganden-System zur Annahme der Beteiligung des Rezeptors an der Entstehung der Anergisierung bei. Es wurde daher angenommen, dass das Fehlen des NKG2D-Rezeptors ein Ausbleiben der Erschöpfung der IFN- γ -Produktion zur Folge haben könnte. Man vermutete eine Aktivierung der NK-Zellen und ein Ausbleiben der Suppression der Produktion des Effektorzytokins IFN- γ . Somit könnte ein Überlebensvorteil durch eine effektivere Kontrolle des Tumors durch NK-Zellen und zusätzlicher Aktivierung der adaptiven Immunität entstehen.

Jedoch zeigten die NK-Zellen auch im NKG2D-Rezeptor-defizienten Lymphom-Modell einen aktivierten Phänotyp bei starker Dysfunktion (Abbildung 11 und 12-17). Das signifikant frühere Erkranken der NKG2D-Rezeptor-defizienten *c-myc*-transgenen Mäuse widerlegt deutlich die Hypothese eines möglichen Überlebensvorteils bei Fehlen des NKG2D-Rezeptors. Die Beobachtung der gravierenden Dysfunktion der NKG2D-Rezeptor-defizienten NK-Zellen gab Anlass zu neuen Überlegungen bezüglich der Rolle des NKG2D-Rezeptors in der NK-Zell-Funktion.

Es scheint, als käme dem NKG2D-Rezeptor eine Schlüsselrolle in der Induktion der Zytotoxizität zu. Zwar wurden für humane *In-vitro*-Modelle NKG2D-unabhängige Möglichkeiten der Auslösung der NK-Zell-Zytotoxizität beschrieben [35, 87]. Hingegen konnte im autochthonen NKG2D-Rezeptor-defizienten Lymphommodell weder eine zytotoxische Aktivität *in vitro* noch eine Degranulation *in vivo* festgestellt werden (Abbildungen 12 und 13). Ergänzend konnte im *c-myc*-transgenen Spontanlymphom eine Tumorevasion bei Blockierung der NKG2D-Liganden nachgewiesen werden [89].

Zudem könnte das Fehlen des NKG2D-Rezeptors weitere funktionelle Störungen der NK-Zellen hervorrufen. Diese Hypothese würde die bisherige Rolle des Rezeptors im Sinne einer Modulation anderer Rezeptor-Systeme erweitern und kann durch zwei Beobachtungen gestützt werden.

Erstens ist die signifikante Reduktion von CD3 ζ auf NK-Zellen von Bedeutung (Abbildung 17). Die CD3 ζ -Kette vermittelt als transmembraner Signal-Adaptor diverser Rezeptoren u.a. die Funktionen des T-Zell-Rezeptors (TZR), des IgG-Rezeptors CD16 und der aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren Nkp30 und Nkp46 [111, 112, 126]. Hanaoka *et al.* stellten einen Zusammenhang zwischen einer Abnahme des NKG2D-Rezeptors und einer proteolytischen Reduktion der CD3 ζ -Kette fest [114]. Die NKG2D-vermittelte Proteolyse von CD3 ζ hat Störungen der Signalkaskaden von CD16, Nkp46, Nkp30 und des TZRs zur Folge und führt zu funktionellen Einschränkungen, die mehrere Zellpopulationen umfassen.

Ferner zeigten Coudert *et al.*, dass eine chronische Stimulierung von Rezeptoren, deren Sig-

nalkaskaden über DAP10 und DAP12 ablaufen, eine reversible Suppression anderer, DAP10/DAP12-unabhängiger, Rezeptoren zur Folge hat [127]. Da die chronische Stimulation des über DAP10/DAP12 signalisierenden NKG2D-Rezeptors zum Funktionsverlust des Rezeptors führt, könnten funktionelle Aberrationen anderer Rezeptorsysteme auch bei NKG2D-Rezeptor-Defizienz vorliegen [49, 60, 61, 93].

Es ist daher anzunehmen, dass das Fehlen des NKG2D-Rezeptors im Spontanlymphom-Modell andere aktivierende Rezeptor-Systeme der NK-Zellen funktionell beeinträchtigt. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die tiefgreifende funktionelle Störung bei NKG2D-Rezeptor-Defizienz sein und sollte weiter untersucht werden.

4.3 IN-VIVO-AKTIVIERUNGSMODELL FÜR NK-ZELLEN

North *et al.* beschrieben für die Aktivierung von NK-Zellen *in vitro* ein Zweischnitt-Modell. Demnach muss zur Auslösung einer zytotoxischen NK-Zell-Reaktion eine Präaktivierung erfolgen. Dieser erste Schritt kann z. B. durch fehlendes Selbst oder durch Stimulation mit IL-2 erfolgen [73, 87]. Zur Auslösung der Zytotoxizität *in vitro* wurde eine sekundäre Aktivierung der NK-Zellen über NZR benötigt [87]. Auch die Stimulation des NKG2D-Rezeptors wurde als sekundärer aktivierender Schritt im Aktivierungs-Modell der NK-Zellen nach North *et al.* identifiziert [73].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das von Brenner *et al.* postulierte Zweischnitt-Modell der *In-vivo*-Aktivierung von NK-Zellen auch für das NKG2D-Rezeptor-defiziente Mausmodell gültig ist [73]. Es zeigte sich ein durch Hochregulation der Aktivierungsmarker CD69 und CD45R gekennzeichneten Zustand der Präaktivierung der NKG2D-Rezeptor-defizienten NK-Zellen im Tumormilieu (Abbildung 10). Es konnte aber bei Fehlen eines Zytotoxizitäts-auslösenden sekundären Schrittes weder eine zytotoxische Aktivität *in vitro* noch eine Degranulation der NK-Zellen *in vivo* registriert werden (Abbildungen 12 und 13). Ähnliche Beobachtungen konnten auch nach Injektion von Tumorzellen der Linie myc-B, die durch „fehlendes Selbst“ und Expression von NKG2D-Liganden gekennzeichnet ist, in NKG2D-Rezeptor-defizienten Mäusen festgestellt werden. Die NKG2D-Rezeptor-defizienten NK-Zellen zeigten zwar eine im Sinne einer Präaktivierung erhöhte IFN- γ -Produktion konnten aber im Gegensatz zum Wildtypen die injizierten Tumorzellen nicht abstoßen [104]. Dies beweist zum einen, dass die Präaktivierung der NK-Zellen ohne Beteiligung des NKG2D-Rezeptors abläuft. Zum anderen ist ein sekundär aktivierendes Signal über den NKG2D-Rezeptor für die Auslösung der Zytotoxizität *in vivo* unabdingbar.

4.4 DER NKG2D-REZEPTOR IN DER TUMORIMMUNOLOGIE

Eine intakte NK-Zell-vermittelte Funktion des sekundär aktivierenden NKG2D-Rezeptors wird als protektiv im Rahmen der Tumorummunität erachtet [104, 128, 129]. Dabei erzeugt besonders eine transiente Expression der stressinduzierten Liganden eine schnelle Immunantwort [53, 57, 126]. So konnten z. B. MHC-Klasse-I-kompetente Tumorzellen nach *De-novo*-Expression von NKG2D-Liganden durch NK-Zellen eliminiert werden [25, 128]. Auch Stress, z. B. durch eine Radio-Chemotherapie, kann Tumoren durch eine Induktion von stress-induzierten NKG2D-Liganden gegenüber NK-Zellen sensitivieren [130, 131].

Im Rahmen der Tumorprogression könnte die Modulation der NKG2D-Liganden-Expression daher einen Mechanismus der Immunevasion darstellen. Als molekulare Mechanismen der Tumorevasion wurde zum einen die Retention der Liganden im intrazellulären Kompartiment und zum anderen die Sekretion von löslichen Liganden beschrieben [49, 79, 109, 132].

Eine chronische Rezeptor-Liganden-Interaktion führt zur Internalisierung des Rezeptors, was Störungen der NK-Zell-Zytotoxizität zur Folge hat und somit die Tumorevasion begünstigt [49, 93]. Eine konstitutive Expression von NKG2D-Liganden ist daher mit einer schlechten klinischen Prognose für Tumorpatienten assoziiert [77, 133, 134].

Zudem werden auch andere Zellpopulationen des Immunsystems durch das NKG2D-Rezeptor-Liganden-System in ihrer Funktion beeinträchtigt. So führen z.B. tumorassoziierte MIC-A-Liganden zu einer Proliferation von physiologisch selten vorkommenden NKG2D-Rezeptor-positiven CD4⁺-T-Zellen, die eine immunsuppressive Funktion haben [135].

Schließlich konnte die Expression des NKG2D-Rezeptors auf Tumorzellen selbst nachgewiesen werden. Dazu zeigte die Analyse verschiedener Tumoren eine Expression des NKG2D-DAP10-Rezeptor-Komplexes. *In vitro* konnte der Komplex eine Autostimulation der Tumorzellen hervorrufen [136]. Dies lässt in dieser Situation eine Funktion vermuten, die der eines onkogenen Wachstumsrezeptors gleicht.

4.5 IMMUNEVASION IM SPONTANLYMPHOM

Das *c-myc*-transgene Spontanlymphom-Modell zeigt eine stadienabhängige progrediente Reduktion der Oberflächenkonzentration der NKG2D-Liganden [73]. Die Reduktion der Liganden erfolgte dabei nach direktem Zellkontakt zwischen NK- und Tumorzellen [89]. Bei NKG2D-Rezeptor-Defizienz konnte im Rahmen dieser Arbeit auf Tumor-B-Zellen eine Persistenz der NKG2D-Liganden auch in klinisch fortgeschrittenen Tumorstadien gezeigt werden

(Abbildung 16). Ähnliche Beobachtungen machten auch Guerra *et al.* in einem murinen NKG2D-Rezeptor-defizienten Prostata-Adenokarzinom [91]. In Zusammenschau mit dem früheren Auftreten der Lymphome bei NKG2D-Rezeptor-Defizienz lässt sich eine Beteiligung des NKG2D-Rezeptor-Liganden Systems an der Kontrolle des autochthonen B-Zell-Lymphoms ableiten (Abbildung 18). Unter Berücksichtigung der bisher in der Tumorummunologie nicht eindeutig beschriebenen Rolle des Rezeptors scheint seine intakte Funktion im Spontanlymphom-Modell von enormer Bedeutung. Wahrscheinlich gilt dies besonders für die frühe Phase der Tumorprogression, die durch eine Expression der NKG2D-Liganden gekennzeichnet ist.

4.6 KLINISCH-THERAPEUTISCHE PERSPEKTIVEN

Die Bedeutung von Modellorganismen in der Grundlagenforschung lässt sich an der hohen Anzahl daraus hervorgegangener therapeutischer Ansätze erkennen. Im Rahmen der angeborenen Immunität vermitteln murine und humane NK-Zellen gleichsinnige biologische Antworten. Beide Spezies unterscheiden sich z.B. in der Gruppe der inhibierenden Rezeptoren [25, 40]. Hingegen bestehen bezüglich der aktivierenden Rezeptoren der NK-Zellen keine Unterschiede [25]. So ist auch der NKG2D-Rezeptor in beiden Spezies vorhanden [52].

Studien und die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass eine eingeschränkte NK-Zell-Funktion mit einer negativen Prognose für Patienten einhergeht [72, 76] (Abbildung 18). Bei Störungen der Effektorzellen der angeborenen Abwehr kommt es zu Immunevasion und Progression von Tumoren. Ihre Rolle in der Tumorüberwachung rückten NK-Zellen in letzter Zeit in den Fokus der onkologischen Therapieforschung [78]. Neben allgemeinen Ansätzen, wie einer Verabreichung funktionssteigernder Zytokine, wird auch der adoptive NK-Zell-Transfer als therapeutische Option angesehen [78, 137].

Das NKG2D-System ist aufgrund der fast ausschließlich auf pathologisch veränderten Zellen vorkommenden Liganden Ziel therapeutischer Forschung [77, 131, 137, 138]. Eine spezifische Rekrutierung der NKG2D-Rezeptor-tragenden Zellen ist durch Fusionsprodukte aus monoklonalen Anti-Tumor-Antikörpern und NKG2D-Liganden möglich. So zeigte u. a. ein chimäres Konstrukt eines gegen das Tumor-assoziierte Karzinoembryonale Antigen gerichteten Antikörpers in Verbindung mit MIC-A-Liganden *in vitro* eine gesteigerte NKG2D-abhängige Zytotoxizität der NK-Zellen [139]. Auch CD8⁺-T-Zellen, die normalerweise über das NKG2D-System nur kostimuliert werden, konnten über ein Fusionsprodukt des NKG2D-Rezeptors und der CD3ζ-Kette primär aktiviert werden [140].

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der molekulare Effekt einiger Chemotherapien, z. B. 5-Fluorouracil, Bortezomib und Resveratrol, sich u.a. auf einer vermehrten Expression von NKG2D-Liganden begründet [141-143].

Unter Berücksichtigung dieser Arbeit erscheint, v. a. in fortgeschrittenen Tumorstadien, eine Induktion bzw. Re-Induktion von NKG2D-Liganden als onkologische Immuntherapie sinnvoll [128, 143]. Das Ziel wäre hierbei eine Re-Sensitivierung des Tumors gegenüber einer zytotoxischen NK-Zell-Antwort. Diese Maßnahme könnte auch den therapeutischen Effekt eines adoptiven NK-Zell-Transfers positiv beeinflussen.

4.7 AUSBLICK

Die Analyse der NK-Zellen im NKG2D-Rezeptor-defizienten Lymphom ergab Hinweise zur Rolle des Rezeptors in der Immunevasion im autochthonen Lymphom. Jedoch gingen aus der Arbeit auch einige Fragen hervor. Deren Beantwortung könnte zum weiteren Verständnis der Rolle des NKG2D-Rezeptors, auch in seiner Funktion als potenzielles immuntherapeutisches Ziel, beitragen.

Im Hinblick auf die NK-Zellen scheint bei NKG2D-Rezeptor-Defizienz eine tiefgreifende funktionelle Dysregulation vorzuliegen. Diese konnte hypothetisch mit einer reduzierten CD3 ζ -Expression oder einer funktionellen Aberration weiterer aktivierender Rezeptoren in Verbindung gebracht werden. Daher sollten Rezeptoren wie z. B. CD16, NKp30 und NKp46 auf Funktionseinschränkungen untersucht werden. Zur Verifizierung der Hypothese sollten dann auch der TZR der NKG2D-Rezeptor-positiven T-Zell-Subpopulation und die NKT-Zellen analysiert werden. Ferner sollte der molekulare Mechanismus der IFN- γ -Dysregulation der NKG2D-Rezeptor-defizienten Zellen detailliert untersucht werden. Eine Prüfung möglicher therapeutischer Ansätze, z. B. durch späte Induktion von NKG2D-Liganden, sollte in Erwägung gezogen werden.

5 Literaturverzeichnis

1. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, et al.; *Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state*; Nature; 2007, 450(7171): p. 903-7.
2. Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA; *Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis*; Nat Rev Immunol; 2006, 6(12): p. 940-52.
3. Ozdemir O; *Severe combined immune deficiency in an adenosine deaminase-deficient patient*; Allergy Asthma Proc; 2006, 27(2): p. 172-4.
4. Longo DL, Steis RG, Lane HC, et al.; *Malignancies in the AIDS patient: natural history, treatment strategies, and preliminary results*; Ann N Y Acad Sci; 1984, 437: p. 421-30.
5. Janoff EN, Rubins JB; *Invasive pneumococcal disease in the immunocompromised host*; Microb Drug Resist; 1997, 3(3): p. 215-32.
6. Kaisho T, Akira S; *Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity*; Acta Odontol Scand; 2001, 59(3): p. 124-30.
7. Munz C, Steinman RM, Fujii S; *Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity*; J Exp Med; 2005, 202(2): p. 203-7.
8. Kalinski P, Giermasz A, Nakamura Y, et al.; *Helper role of NK cells during the induction of anticancer responses by dendritic cells*; Mol Immunol; 2005, 42(4): p. 535-9.
9. Kalinski P, Mailliard RB, Giermasz A, et al.; *Natural killer-dendritic cell cross-talk in cancer immunotherapy*; Expert Opin Biol Ther; 2005, 5(10): p. 1303-15.
10. Fernandez NC, Lozier A, Flament C, et al.; *Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo*; Nat Med; 1999, 5(4): p. 405-11.
11. Lucas M, Schachterle W, Oberle K, et al.; *Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15*; Immunity; 2007, 26(4): p. 503-17.
12. Zitvogel L, Terme M, Borg C, et al.; *Dendritic cell-NK cell cross-talk: regulation and physiopathology*; Curr Top Microbiol Immunol; 2006, 298: p. 157-74.
13. Mocikat R, Braumuller H, Gumy A, et al.; *Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses*; Immunity; 2003, 19(4): p. 561-9.
14. Guernonprez P, Amigorena S; *Pathways for antigen cross presentation*; Springer Semin Immunopathol; 2005, 26(3): p. 257-71.
15. Norment AM, Salter RD, Parham P, et al.; *Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules*; Nature; 1988, 336(6194): p. 79-81.
16. Villadangos JA; *Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them*; Mol Immunol; 2001, 38(5): p. 329-46.
17. Lodoen MB, Lanier LL; *Natural killer cells as an initial defense against pathogens*; Curr Opin Immunol; 2006, 18(4): p. 391-8.
18. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, et al.; *Functions of natural killer cells*; Nat Immunol; 2008, 9(5): p. 503-10.
19. Biron CA, Byron KS, Sullivan JL; *Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells*; N Engl J Med; 1989, 320(26): p. 1731-5.
20. Orange JS; *Human natural killer cell deficiencies*; Curr Opin Allergy Clin Immunol; 2006, 6(6): p. 399-409.
21. Zompi S, Colucci F; *Anatomy of a murder--signal transduction pathways leading to activation of natural killer cells*; Immunol Lett; 2005, 97(1): p. 31-9.
22. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, et al.; *Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells*; Immunol Rev; 2006, 214: p. 73-91.
23. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, et al.; *Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines*; Annu Rev Immunol; 1999, 17: p. 189-220.
24. Ortaldo JR, Winkler-Pickett R, Wigginton J, et al.; *Regulation of ITAM-positive receptors: role of IL-12 and IL-18*; Blood; 2006, 107(4): p. 1468-75.
25. Diefenbach A, Raulet DH; *Strategies for target cell recognition by natural killer cells*; Immunol Rev; 2001, 181: p. 170-84.
26. Kelley J, Walter L, Trowsdale J; *Comparative genomics of natural killer cell receptor gene clusters*; PLoS Genet; 2005, 1(2): p. 129-39.

27. **MacFarlane AWt, Campbell KS**; *Signal transduction in natural killer cells*; Curr Top Microbiol Immunol; 2006, 298: p. 23-57.
28. **Bottino C, Castriconi R, Moretta L, et al.**; *Cellular ligands of activating NK receptors*; Trends Immunol; 2005, 26(4): p. 221-6.
29. **Lanier LL**; *NK cell recognition*; Annu Rev Immunol; 2005, 23: p. 225-74.
30. **Elboim M, Gazit R, Gur C, et al.**; *Tumor immunoediting by Nkp46*; J Immunol; 2010, 184(10): p. 5637-44.
31. **Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, et al.**; *Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells*; J Exp Med; 1998, 188(12): p. 2375-80.
32. **Ferlazzo G, Thomas D, Lin SL, et al.**; *The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic*; J Immunol; 2004, 172(3): p. 1455-62.
33. **Perussia B**; *Fc receptors on natural killer cells*; Curr Top Microbiol Immunol; 1998, 230: p. 63-88.
34. **Radaev S, Motyka S, Fridman WH, et al.**; *The structure of a human type III Fcγ receptor in complex with Fc*; J Biol Chem; 2001, 276(19): p. 16469-77.
35. **Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, et al.**; *Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion*; Blood; 2006, 107(1): p. 159-66.
36. **Ravetch JV, Lanier LL**; *Immune inhibitory receptors*; Science; 2000, 290(5489): p. 84-9.
37. **Binstadt BA, Brumbaugh KM, Dick CJ, et al.**; *Sequential involvement of Lck and SHP-1 with MHC-recognizing receptors on NK cells inhibits FcR-initiated tyrosine kinase activation*; Immunity; 1996, 5(6): p. 629-38.
38. **Burshtyn DN, Scharenberg AM, Wagtmann N, et al.**; *Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor*; Immunity; 1996, 4(1): p. 77-85.
39. **Ljunggren HG, Karre K**; *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition*; Immunol Today; 1990, 11(7): p. 237-44.
40. **Lee N, Llano M, Carretero M, et al.**; *HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A*; Proc Natl Acad Sci U S A; 1998, 95(9): p. 5199-204.
41. **Borrego F, Ulbrecht M, Weiss EH, et al.**; *Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis*; J Exp Med; 1998, 187(5): p. 813-8.
42. **Vance RE, Jamieson AM, Raulet DH**; *Recognition of the class Ib molecule Qa-1(b) by putative activating receptors CD94/NKG2C and CD94/NKG2E on mouse natural killer cells*; J Exp Med; 1999, 190(12): p. 1801-12.
43. **Toyama-Sorimachi N, Taguchi Y, Yagita H, et al.**; *Mouse CD94 participates in Qa-1-mediated self recognition by NK cells and delivers inhibitory signals independent of Ly-49*; J Immunol; 2001, 166(6): p. 3771-9.
44. **Bossi G, Griffiths GM**; *CTL secretory lysosomes: biogenesis and secretion of a harmful organelle*; Semin Immunol; 2005, 17(1): p. 87-94.
45. **Metkar SS, Wang B, Aguilar-Santelises M, et al.**; *Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation*; Immunity; 2002, 16(3): p. 417-28.
46. **Trapani JA, Smyth MJ**; *Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway*; Nat Rev Immunol; 2002, 2(10): p. 735-47.
47. **Kumar V, McNerney ME**; *A new self: MHC-class-I-independent natural-killer-cell self-tolerance*; Nat Rev Immunol; 2005, 5(5): p. 363-74.
48. **Bauer S, Groh V, Wu J, et al.**; *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA*; Science; 1999, 285(5428): p. 727-9.
49. **Groh V, Wu J, Yee C, et al.**; *Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation*; Nature; 2002, 419(6908): p. 734-8.
50. **Jamieson AM, Diefenbach A, McMahon CW, et al.**; *The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing*; Immunity; 2002, 17(1): p. 19-29.
51. **Barber A, Sentman CL**; *NKG2D receptor regulates human effector T-cell cytokine production*; Blood; 2011, 117(24): p. 6571-81.
52. **Raulet DH**; *Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands*; Nat Rev Immunol; 2003, 3(10): p. 781-90.

53. **Champsaur M, Lanier LL**; *Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses*; Immunol Rev; 2010, 235(1): p. 267-85.
54. **Huntington ND, Vosshehrich CA, Di Santo JP**; *Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans*; Nat Rev Immunol; 2007, 7(9): p. 703-14.
55. **Nausch N, Cerwenka A**; *NKG2D ligands in tumor immunity*; Oncogene; 2008, 27(45): p. 5944-58.
56. **Diefenbach A, Hsia JK, Hsiung MY, et al.**; *A novel ligand for the NKG2D receptor activates NK cells and macrophages and induces tumor immunity*; Eur J Immunol; 2003, 33(2): p. 381-91.
57. **Diefenbach A, Jamieson AM, Liu SD, et al.**; *Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages*; Nat Immunol; 2000, 1(2): p. 119-26.
58. **Groh V, Rhinehart R, Secrist H, et al.**; *Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB*; Proc Natl Acad Sci U S A; 1999, 96(12): p. 6879-84.
59. **Stern-Ginossar N, Mandelboim O**; *An integrated view of the regulation of NKG2D ligands*; Immunology; 2009, 128(1): p. 1-6.
60. **Wu J, Cherwinski H, Spies T, et al.**; *DAP10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative, receptor complexes in natural killer cells*; J Exp Med; 2000, 192(7): p. 1059-68.
61. **Lanier LL**; *DAP10- and DAP12-associated receptors in innate immunity*; Immunol Rev; 2009, 227(1): p. 150-60.
62. **Hanahan D, Weinberg RA**; *The hallmarks of cancer*; Cell; 2000, 100(1): p. 57-70.
63. **Hanahan D, Weinberg RA**; *Hallmarks of cancer: the next generation*; Cell; 2011, 144(5): p. 646-74.
64. **Vajdic CM, van Leeuwen MT, Webster AC, et al.**; *Cutaneous melanoma is related to immune suppression in kidney transplant recipients*; Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 2009, 18(8): p. 2297-303.
65. **Thomas L**; *On immunosurveillance in human cancer*; Yale J Biol Med; 1982, 55(3-4): p. 329-33.
66. **Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, et al.**; *Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice*; J Immunol; 1995, 154(1): p. 180-91.
67. **Kim R, Emi M, Tanabe K**; *Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape*; Immunology; 2007, 121(1): p. 1-14.
68. **Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD**; *The three Es of cancer immunoediting*; Annu Rev Immunol; 2004, 22: p. 329-60.
69. **Teng MW, Swann JB, Koebel CM, et al.**; *Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer*; J Leukoc Biol; 2008, 84(4): p. 988-93.
70. **Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD**; *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*; Immunity; 2004, 21(2): p. 137-48.
71. **Imai K, Matsuyama S, Miyake S, et al.**; *Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population*; Lancet; 2000, 356(9244): p. 1795-9.
72. **Stojanovic A, Cerwenka A**; *Natural killer cells and solid tumors*; J Innate Immun; 2011, 3(4): p. 355-64.
73. **Brenner CD, King S, Przewoznik M, et al.**; *Requirements for control of B-cell lymphoma by NK cells*; Eur J Immunol; 2010, 40(2): p. 494-504.
74. **Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, et al.**; *The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma*; Cancer; 1997, 79(12): p. 2320-8.
75. **Costello RT, Sivori S, Marcenaro E, et al.**; *Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia*; Blood; 2002, 99(10): p. 3661-7.
76. **Deschoolmeester V, Baay M, Van Marck E, et al.**; *Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal cancer patients*; BMC Immunol; 2010, 11: p. 19.
77. **Coudert JD, Held W**; *The role of the NKG2D receptor for tumor immunity*; Semin Cancer Biol; 2006, 16(5): p. 333-43.
78. **Sutlu T, Alici E**; *Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects*; J Intern Med; 2009, 266(2): p. 154-81.
79. **Fuertes MB, Girart MV, Molinero LL, et al.**; *Intracellular retention of the NKG2D ligand MHC class I chain-related gene A in human melanomas confers immune privilege and prevents NK cell-mediated cytotoxicity*; J Immunol; 2008, 180(7): p. 4606-14.
80. **Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, et al.**; *ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor*; Immunity; 2001, 14(2): p. 123-33.

81. **Jonjic S, Polic B, Krmpotic A**; *Viral inhibitors of NKG2D ligands: friends or foes of immune surveillance?*; Eur J Immunol; 2008, 38(11): p. 2952-6.
82. **Tomasec P, Braud VM, Rickards C, et al.**; *Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40*; Science; 2000, 287(5455): p. 1031.
83. **Burkitt D**; *A sarcoma involving the jaws in African children*; Br J Surg; 1958, 46(197): p. 218-23.
84. **Herold G**; *Innere Medizin*. Herold DmG, editor. Köln: Verlag Arzt + Information; 2010.
85. **Molyneux EM, Rochford R, Griffin B, et al.**; *Burkitt's lymphoma*; Lancet; 2012, 379(9822): p. 1234-44.
86. **Kovalchuk AL, Qi CF, Torrey TA, et al.**; *Burkitt lymphoma in the mouse*; J Exp Med; 2000, 192(8): p. 1183-90.
87. **North J, Bakhsh I, Marden C, et al.**; *Tumor-primed human natural killer cells lyse NK-resistant tumor targets: evidence of a two-stage process in resting NK cell activation*; J Immunol; 2007, 178(1): p. 85-94.
88. **Adam C, King S, Allgeier T, et al.**; *DC-NK cell cross talk as a novel CD4+ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction*; Blood; 2005, 106(1): p. 338-44.
89. **Brenner CD**; *Untersuchungen zur Bedeutung von Natürlichen Killerzellen und T-Zellen in einem murinen Spontan-Tumormodell*. München: Ludwig-Maximilians-Universität; 2009.
90. **Pende D, Cantoni C, Rivera P, et al.**; *Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin*; Eur J Immunol; 2001, 31(4): p. 1076-86.
91. **Guerra N, Tan YX, Joncker NT, et al.**; *NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy*; Immunity; 2008, 28(4): p. 571-80.
92. **Przewoznik M**; *Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von natürlichen Killerzellen in einem murinen Spontan-Tumormodell*. München: Ludwig-Maximilians-Universität; 2011.
93. **Ogasawara K, Hamerman JA, Hsin H, et al.**; *Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice*; Immunity; 2003, 18(1): p. 41-51.
94. **Zafirova B, Mandaric S, Antulov R, et al.**; *Altered NK cell development and enhanced NK cell-mediated resistance to mouse cytomegalovirus in NKG2D-deficient mice*; Immunity; 2009, 31(2): p. 270-82.
95. **Chiossone L, Chaix J, Fuseri N, et al.**; *Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program*; Blood; 2009, 113(22): p. 5488-96.
96. **Hayakawa Y, Smyth MJ**; *CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity*; J Immunol; 2006, 176(3): p. 1517-24.
97. **Marzio R, Jirillo E, Ransijn A, et al.**; *Expression and function of the early activation antigen CD69 in murine macrophages*; J Leukoc Biol; 1997, 62(3): p. 349-55.
98. **Ballas ZK, Rasmussen W**; *Lymphokine-activated killer cells. VII. IL-4 induces an NK1.1+CD8 alpha+beta- TCR-alpha beta B220+ lymphokine-activated killer subset*; J Immunol; 1993, 150(1): p. 17-30.
99. **Kiessling R, Klein E, Wigzell H**; *"Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype*; Eur J Immunol; 1975, 5(2): p. 112-7.
100. **Kiessling R, Klein E, Pross H, et al.**; *"Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell*; Eur J Immunol; 1975, 5(2): p. 117-21.
101. **Chang MH, Karageorgos LE, Meikle PJ**; *CD107a (LAMP-1) and CD107b (LAMP-2)*; J Biol Regul Homeost Agents; 2002, 16(2): p. 147-51.
102. **Alter G, Malenfant JM, Altfeld M**; *CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity*; J Immunol Methods; 2004, 294(1-2): p. 15-22.
103. **Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, et al.**; *Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity*; Cell Immunol; 2009, 254(2): p. 149-54.
104. **Belting L, Homberg N, Przewoznik M, et al.**; *Critical role of the NKG2D receptor for NK cell-mediated control and immune escape of B-cell lymphoma*; Eur J Immunol; 2015, 45(9): p. 2593-601.
105. **Lee BN, Duvic M, Tang CK, et al.**; *Dysregulated synthesis of intracellular type 1 and type 2 cytokines by T cells of patients with cutaneous T-cell lymphoma*; Clin Diagn Lab Immunol; 1999, 6(1): p. 79-84.
106. **Gadina M, Hilton D, Johnston JA, et al.**; *Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after*; Curr Opin Immunol; 2001, 13(3): p. 363-73.
107. **Rot A, Krieger M, Brunner T, et al.**; *RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes*; J Exp Med; 1992, 176(6): p. 1489-95.

108. **Papadavid E, Economidou J, Psarra A, et al.**; *The relevance of peripheral blood T-helper 1 and 2 cytokine pattern in the evaluation of patients with mycosis fungoides and Sezary syndrome*; Br J Dermatol; 2003, 148(4): p. 709-18.
109. **Salih HR, Antropius H, Gieseke F, et al.**; *Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia*; Blood; 2003, 102(4): p. 1389-96.
110. **Lee JC, Lee KM, Kim DW, et al.**; *Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients*; J Immunol; 2004, 172(12): p. 7335-40.
111. **Lanier LL**; *Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition*; Nat Immunol; 2008, 9(5): p. 495-502.
112. **Moretta A, Bottino C, Vitale M, et al.**; *Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity*; Annu Rev Immunol; 2001, 19: p. 197-223.
113. **Baniyash M**; *TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response*; Nat Rev Immunol; 2004, 4(9): p. 675-87.
114. **Hanaoka N, Jabri B, Dai Z, et al.**; *NKG2D initiates caspase-mediated CD3zeta degradation and lymphocyte receptor impairments associated with human cancer and autoimmune disease*; J Immunol; 2010, 185(10): p. 5732-42.
115. **Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, et al.**; *Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma*; Cancer; 2000, 88(3): p. 577-83.
116. **Brauner H, Elemans M, Lemos S, et al.**; *Distinct phenotype and function of NK cells in the pancreas of nonobese diabetic mice*; J Immunol; 2010, 184(5): p. 2272-80.
117. **Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, et al.**; *Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming*; Nat Immunol; 2004, 5(12): p. 1260-5.
118. **Ziegler A, Heidenreich R, Braumuller H, et al.**; *EpCAM, a human tumor-associated antigen promotes Th2 development and tumor immune evasion*; Blood; 2009, 113(15): p. 3494-502.
119. **Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, et al.**; *Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition*; Blood; 2010, 115(11): p. 2167-76.
120. **Belardelli F**; *Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response*; Apmis; 1995, 103(3): p. 161-79.
121. **Gattoni A, Parlato A, Vangieri B, et al.**; *Interferon-gamma: biologic functions and HCV therapy (type I/II) (2 of 2 parts)*; Clin Ter; 2006, 157(5): p. 457-68.
122. **Candido EB, Silva LM, Carvalho AT, et al.**; *Immune Response Evaluation Through Determination of Type 1, Type 2, and Type 17 Patterns in Patients With Epithelial Ovarian Cancer*; Reprod Sci; 2012.
123. **Bleotu C, Chifiriuc MC, Grigore R, et al.**; *Investigation of Th1/Th2 cytokine profiles in patients with laryngo-pharyngeal, HPV-positive cancers*; Eur Arch Otorhinolaryngol; 2012.
124. **Lai P, Rabinowich H, Crowley-Nowick PA, et al.**; *Alterations in expression and function of signal-transducing proteins in tumor-associated T and natural killer cells in patients with ovarian carcinoma*; Clin Cancer Res; 1996, 2(1): p. 161-73.
125. **Rabinowich H, Suminami Y, Reichert TE, et al.**; *Expression of cytokine genes or proteins and signaling molecules in lymphocytes associated with human ovarian carcinoma*; Int J Cancer; 1996, 68(3): p. 276-84.
126. **Bottino C, Moretta L, Pende D, et al.**; *Learning how to discriminate between friends and enemies, a lesson from Natural Killer cells*; Mol Immunol; 2004, 41(6-7): p. 569-75.
127. **Coudert JD, Scarpellino L, Gros F, et al.**; *Sustained NKG2D engagement induces cross-tolerance of multiple distinct NK cell activation pathways*; Blood; 2008, 111(7): p. 3571-8.
128. **Cerwenka A, Baron JL, Lanier LL**; *Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo*; Proc Natl Acad Sci U S A; 2001, 98(20): p. 11521-6.
129. **Smyth MJ, Swann J, Cretney E, et al.**; *NKG2D function protects the host from tumor initiation*; J Exp Med; 2005, 202(5): p. 583-8.
130. **Raulet DH, Guerra N**; *Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors*; Nat Rev Immunol; 2009, 9(8): p. 568-80.
131. **Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, et al.**; *The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor*; Nature; 2005, 436(7054): p. 1186-90.
132. **Salih HR, Holdenrieder S, Steinle A**; *Soluble NKG2D ligands: prevalence, release, and functional impact*; Front Biosci; 2008, 13: p. 3448-56.

133. **Li K, Mandai M, Hamanishi J, et al.**; *Clinical significance of the NKG2D ligands, MICA/B and ULBP2 in ovarian cancer: high expression of ULBP2 is an indicator of poor prognosis*; *Cancer Immunol Immunother*; 2009, 58(5): p. 641-52.
134. **Duan X, Deng L, Chen X, et al.**; *Clinical significance of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule A and NKG2D receptor on NK cells in pancreatic cancer*; *Med Oncol*; 2011, 28(2): p. 466-74.
135. **Groh V, Smythe K, Dai Z, et al.**; *Fas-ligand-mediated paracrine T cell regulation by the receptor NKG2D in tumor immunity*; *Nat Immunol*; 2006, 7(7): p. 755-62.
136. **Benitez AC, Dai Z, Mann HH, et al.**; *Expression, signaling proficiency, and stimulatory function of the NKG2D lymphocyte receptor in human cancer cells*; *Proc Natl Acad Sci U S A*; 2011, 108(10): p. 4081-6.
137. **Terme M, Ullrich E, Delahaye NF, et al.**; *Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies*; *Nat Immunol*; 2008, 9(5): p. 486-94.
138. **Smyth MJ, Swann J, Kelly JM, et al.**; *NKG2D recognition and perforin effector function mediate effective cytokine immunotherapy of cancer*; *J Exp Med*; 2004, 200(10): p. 1325-35.
139. **Germain C, Larbouret C, Cesson V, et al.**; *MHC class I-related chain A conjugated to antitumor antibodies can sensitize tumor cells to specific lysis by natural killer cells*; *Clin Cancer Res*; 2005, 11(20): p. 7516-22.
140. **Zhang T, Lemoi BA, Sentman CL**; *Chimeric NK-receptor-bearing T cells mediate antitumor immunotherapy*; *Blood*; 2005, 106(5): p. 1544-51.
141. **Hu L, Cao D, Li Y, et al.**; *Resveratrol sensitized leukemia stem cell-like KG-1a cells to cytokine-induced killer cells-mediated cytotoxicity through NKG2D ligands and TRAIL receptors*; *Cancer Biol Ther*; 2012, 13(7): p. 516-26.
142. **Khallouf H, Marten A, Serba S, et al.**; *5-Fluorouracil and interferon-alpha immunochemotherapy enhances immunogenicity of murine pancreatic cancer through upregulation of NKG2D ligands and MHC class I*; *J Immunother*; 2012, 35(3): p. 245-53.
143. **Jardine L, Hambleton S, Bigley V, et al.**; *Sensitizing primary acute lymphoblastic leukemia to natural killer cell recognition by induction of NKG2D ligands*; *Leuk Lymphoma*; 2012.

6 Anhang

6.1 VERÖFFENTLICHUNGEN

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Molekulare Immunologie des Helmholtz-Zentrums München erstellt. Prof. Dr. med. Ralph Mocikat hatte die Fachvertretung für die Fakultät der Humanmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München inne.

Teile der Arbeit wurden veröffentlicht:

Originalpublikationen :

Belting L, Homberg N, Przewoznik M, et al.; *Critical role of the NKG2D receptor for NK cell-mediated control and immune escape of B-cell lymphoma*; Eur J Immunol; 2015, 45(9): p. 2593-601.

6.2 DANKSAGUNG

Mein Dank gebührt insbesondere Herrn Prof. Dr. med. Ralph Mocikat, dessen fachliche Anregungen, gute Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft die Grundsteine zum Gelingen dieser Doktorarbeit legten. Die Zusammenarbeit zeichnete sich durch ein freundliches konstruktives Arbeitsklima und Hilfsbereitschaft aus.

Ebenfalls herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen Kollegen der Arbeitsgruppe und des Institutes für Molekulare Immunologie. Ihre tatkräftige hilfsbereite Unterstützung, Kollegialität und die positive Arbeitsatmosphäre waren mir eine große Hilfe.

Besonderer Dank gilt Frau Sabine Schlink und allen Mitarbeitern der Tierhaltung für ihre Hilfsbereitschaft und ihre engagierte Betreuung der NKG2D-Rezeptor-defizienten Mäuse. Ferner möchte ich mich herzlichst bei meinen Eltern und meinen Freunden für die Unterstützung während der Zeit der Doktorarbeit bedanken.

6.3 LEBENSLAUF

Name: Lena Christine Belting
Geboren: 12.03.1987 in Frankfurt am Main
Anschrift: Weidenweg 60, 10247 Berlin
Familienstand: Ledig

Schulbildung:

1993- 1997 Grundschule Bad König
1997- 1999 Förderstufe Carl-Weyprecht-Schule Bad König
1999- 2006 Gymnasium Michelstadt

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Note: 1,3

Universitäre Bildung:

Oktober 2007- Mai 2014 Studium der Humanmedizin
 an der Ludwig-Maximilians-Universität München

August 2009 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung,
Mai 2014 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Abschluss: Studium der Humanmedizin, Note: 1,83

Juni 2014 Approbation als Ärztin

Arbeit als Ärztin:

Seit August 2014 Ärztin zur Weiterbildung im Fachbereich Allgemeinchirurgie
 am Helios Klinikum Berlin-Buch

